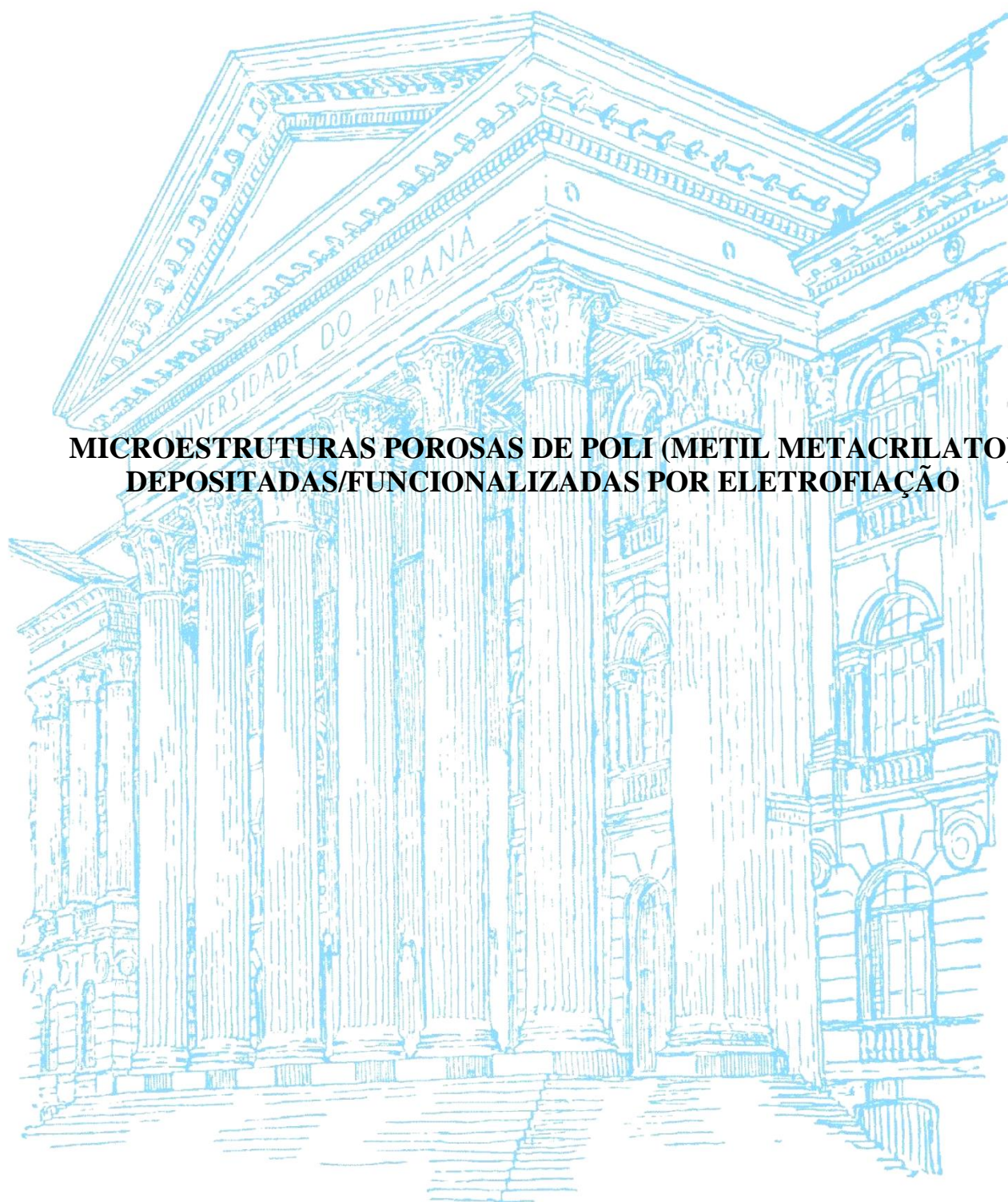


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**BRUNO MORAIS SERAFIM**



**MICROESTRUTURAS POROSAS DE POLI (METIL METACRILATO)  
DEPOSITADAS/FUNCIONALIZADAS POR ELETROFIAÇÃO**

**Curitiba  
2016**

**BRUNO MORAIS SERAFIM**

**MICROESTRUTURAS POROSAS DE POLI (METIL METACRILATO)  
DEPOSITADAS/FUNCIONALIZADAS POR ELETROFIAÇÃO**

**Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre. Área de concentração: Engenharia e Ciência dos Materiais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais - PIPE. Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Cyro Ketzer Saul**

**Curitiba  
2016**

---

S481m

Serafim, Bruno Moraes

Microestruturas porosas de poli(metil metacrilato)  
depositadas/funcionalizadas por eletrofiação/ Bruno Moraes Serafim. –  
Curitiba, 2016.

121 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia,  
Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais - PIPE,  
2016.

Orientador: Cyro Ketzer Saul .

Bibliografia: p. 119-121.

1. Compostos poliméricos. 2. Microestrutura. 3. Ensaio clínico - Doenças.  
I. Universidade Federal do Paraná. II. Saul, Cyro Ketzer. III. Título.

CDD: 620.1127

---



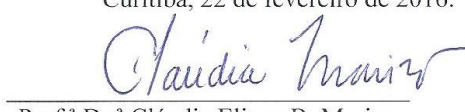
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais- PIPE  
Setor de Tecnologia

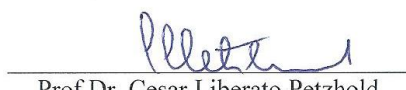
### RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO


Aos vinte e dois dias do mês de fevereiro de 2016, no auditório do CEHPAR - no Centro Politécnico - UFPR, foi instalada pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Sofia C. M. D'Oliveira, coordenadora do PIPE – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, a Banca Examinadora para a trecentésima sexta defesa de dissertação de mestrado na área de concentração: Engenharia e Ciência dos Materiais. Estiveram presentes no ato, além do coordenador do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes. A Banca Examinadora, atendendo a determinação do colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências dos Materiais, foi constituída pelos professores doutores: Prof. Dr. Cyro Ketzer Saul (UFPR), Cláudia Eliana B. Marino (UFPR), Cesar Liberato Petzhold (UFRGS). Às 14:00 horas, a banca iniciou os trabalhos, convidando o candidato **BRUNO MORAIS SERAFIM** a fazer a apresentação da dissertação de mestrado intitulada **“MICROESTRUTURAS POROSAS DE POLI (METIL METACRILATO) DEPOSITADAS/ FUNCIONALIZADAS POR ELETROFIAÇÃO.”**. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes. Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca decidiu pela APROVAÇÃO do candidato, (de acordo com a determinação dos artigos 68 e 69 da resolução 65/09 de 09.11.2009).

Curitiba, 22 de fevereiro de 2016.

  
Prof. Dr. Cyro Ketzer Saul  
Orientador

  
Prof.ª Dr.ª Cláudia Eliana B. Marino  
Examinador

  
Prof. Dr. Cesar Liberato Petzhold  
Examinador

  
Prof.ª Dr.ª Ana Sofia C. M. D'Oliveira  
Coordenadora do PIPE

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cyro K. Saul, pela oportunidade e dedicação na orientação, além dos conhecimentos transmitidos no desenvolvimento conjunto deste trabalho.

À minha esposa, Luciana, pelo amor, companheirismo, compreensão e empolgação com meu trabalho.

Aos meus pais, José e Vanda, pelo árduo esforço em prover a melhor educação para mim e meus irmãos, bem como pelo exemplo de trabalho duro e perseverança em tudo o que fazem na vida.

Aos meus colegas de laboratório, pela amizade e companheirismo, além das experiências e conhecimentos trocados.

Aos professores/alunos M<sup>a</sup> Andressa Amado, Dr. César L. Petzhold, Dr. Leonardo Foti, M<sup>a</sup> Amanda Leitolis e Dr. Claudio Radtke, pela colaboração e pelas dicas.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, especialmente ao técnico Deonir Agustini, pelas medidas realizadas.

À CAPES e CNPq pelo financiamento das atividades.

*“Together we stand, divided we fall...”*

Roger Waters

## RESUMO

Materiais poliméricos com grande área superficial por unidade de massa apresentam grande potencial de aplicação na detecção de doenças, *drug delivery* e engenharia de tecidos, assim como no desenvolvimento de sensores químicos e biológicos. Entretanto, a produção destes materiais é geralmente cara, demorada e/ou complexa. As técnicas de deposição conhecidas como Eletrofiação e Eletrospray são exceções, pois apresentam grande simplicidade experimental e baixo custo, permitindo a produção de nano/microestruturas poliméricas, como esferas, fios e membranas, com controle preciso da morfologia. Conforme já demonstrado por nosso grupo de pesquisa, uma simples alteração no aparato experimental desta técnica permite produzir as mesmas estruturas com a superfície funcionalizada. Neste trabalho foi estudada a produção e caracterização de microestruturas porosas de PMMA superficialmente funcionalizadas, com terminais hidroxilas acoplados às cadeias poliméricas, empregando a técnica de Eletrofiação com Ativação Superficial Induzida (*EISA*). O material produzido foi então utilizado em ensaios de detecções biológicas, no Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), onde demonstrou-se a capacidade de detecção de amostras contaminadas com anticorpos de HIV. A simplicidade de produção destas estruturas, aliada ao baixíssimo custo do processo, garantem grande potencial de aplicação das microestruturas funcionalizadas de PMMA como substratos para ensaios biológicos de detecção de doenças.

## **ABSTRACT**

Polymeric materials with elevated surface area per unit mass have great application potential for diseases detection, drug delivery, tissue engineering, and in the development of chemical and biological sensors as well. However, the production of these materials is generally costly, time consuming and/or complex. Deposition techniques known as Electrospray and Electrospinning are exceptions, due to the great experimental simplicity and low cost involved, allowing the production of nano/polymeric microstructures, such as beads, fibers and membranes with precise morphology control. As it was already shown by our research group, a simple change in the experimental setup allows the production of the same structures with a functionalized surface. In this work, we present the production and characterization of surface functionalized PMMA microstructures, with hydroxyl groups attached to the polymer chains, using the Electrospinning Induced Surface Activation (EISA) technique. The material produced was used for biological assays at the Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) and proved to be able to detect HIV infected samples. The simple procedures applied to produce these structures, associated with their low cost, are evidences of great potential for application as a disease diagnostic substrate.



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Representação de uma unidade de repetição (monômero) da cadeia polimérica do PMMA. (Fonte: Sociedade Brasileira de Química).....	21
Figura 2 – Chapas translúcidas de PMMA de diferentes espessuras. (Fonte: Acridam).....	23
Figura 3 – Utilização de chapas de PMMA na construção de helicópteros. (Fonte: Divulgação) .....	24
Figura 4 – Lentes de PMMA <i>cast</i> utilizadas em instrumentação óptica. (Fonte: Divulgação) .....	24
Figura 5 – Chapas de PMMA <i>cast</i> sendo utilizadas em dispositivos micro fluídicos (Fonte: KLANK <i>et al.</i> , 2002). .....	25
Figura 6 – Lente de PMMA utilizada na substituição de córneas. (Fonte: Cornealring) .....	26
Figura 7 – Radiografia com um exemplo de PMMA utilizado em cimentação óssea. (Fonte: Ijoonline) .....	26
Figura 8 – Exemplos de estruturas depositadas pela técnica de Eletrofiação, por 10 min (à esquerda, micrografia eletrônica de varredura) e por 2 horas (à direita). (Fonte: Acervo do autor) .....	27
Figura 9 – Micrografia eletrônica de varredura de microesferas de Poliestireno (Fonte: Acervo Laboratório de Inovação em Tecnologia de Sensores da UFPR).....	27
Figura 10 – Fotografia de estrutura denominada cone de Taylor .....	29
Figura 11 – Diagrama representativo do aparato experimental da técnica de deposição por Eletrofiação/Eletrospray. Um disco aterrado de alumínio é aqui utilizado como alvo. (Fonte: acervo do autor) .....	31
Figura 12 – Imagem do processo de ejeção da solução e conseguinte separação de fase entre o polímero e o solvente. Graças às dimensões dos fios produzidos é impossível reconhecê-los na imagem. (Acervo do Laboratório de Inovação em Tecnologia de Sensores da UFPR) .....	31
Figura 13 – Imagens do processo de ejeção da solução, exemplificando a utilização de taxas de vazão insuficiente e excessiva, respectivamente. (Acervo do autor) .....	35
Figura 14 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas de PMMA depositadas por Eletrofiação/Eletrospray. Fios (a), esferas (b), “copos” (c) e “anéis” (d) foram produzidos, através da variação da concentração das soluções contendo dimetilformamida como solvente. (Fonte: WANG <i>et al.</i> , 2009).....	37
Figura 15 – Micrografia eletrônica de varredura de estruturas de PMMA depositadas por Eletrofiação. Fios com alta porosidade foram produzidos, utilizando clorofórmio como solvente. (Fonte: MEGELSKI <i>et al.</i> , 2002).....	37

Figura 16 – Diagrama representativo do processo de deposição EISA. (Fonte: Acervo do autor)	39
Figura 17 – Diagrama representativo da solvatação dos íons provenientes da dissociação. (Fonte: FOTI <i>et al.</i> , 2015).	40
Figura 18 – Diagrama representativo da solvatação das microesferas ionizadas de poliestireno. (Fonte: FOTI <i>et al.</i> , 2015).	40
Figura 19 – Diagrama representativo do procedimento completo de ativação: solvatação das microesferas ionizadas, descarregamento das mesmas e incorporação de radicais hidroxilas na superfície das microestruturas. Graças à presença de ligações duplas entre átomos de carbono e oxigênio, tem-se então uma superfície “carboxilada”. (Fonte: FOTI <i>et al.</i> , 2015)	41
Figura 20 – Diagrama simplificado do processo de detecção de antígenos de sífilis, em amostra não contaminada. Sem a presença do anticorpo característico, não ocorre o acoplamento da esfera com a molécula fluorescente. Logo, após a lavagem, nenhum processo de fluorescência é observado (Fonte: FOTI <i>et al.</i> , 2015).	42
Figura 21 – Diagrama simplificado do processo de detecção biológica, em amostra contaminada. Com a presença do anticorpo característico ocorre o acoplamento da esfera com a molécula marcadora. É possível observar então o processo de fluorescência. (Fonte: FOTI <i>et al.</i> , 2015).	42
Figura 22 – Cubos de PMMA obtidos através do corte de chapas acrílicas. (Fonte: Acervo do autor).	44
Figura 23 – Solução de PMMA <i>cast</i> em clorofórmio. Mesma aparência foi observada em todas as soluções produzidas.	46
Figura 24 – Cuba plástica utilizada na técnica de deposição EISA, contendo a solução eletrolítica de ativação	48
Figura 25 – Fonte de alta tensão utilizada.	48
Figura 26 – Bomba de seringa utilizada.	49
Figura 27 – Seringa de vidro utilizada, já com agulha.	49
Figura 28 – Aparato experimental utilizado na técnica de deposição por Eletrofiação tradicional.	50
Figura 29 – Aparato experimental utilizado na técnica de deposição EISA.	51
Figura 30 – Diagrama ilustrativo do processo de separação de partículas por exclusão de tamanho, em coluna de GPC.	52
Figura 31 – Diferentes massas molares e suas abordagens estatísticas.	53

Figura 32 – Equipamento utilizado para realizar as medidas de massa molar dos polímeros. (Fonte: IQ – UFRGS) .....	53
Figura 33 – Reômetro utilizado para medidas de viscosidade. (Fonte: Biopol – UFPR).....	54
Figura 34 – Diagrama ilustrativo do processo de coleta de medidas de microscopia eletrônica de varredura. (Fonte: IF – UFRGS).....	55
Figura 35 – Diagrama demonstrativo da relação entre a profundidade alcançada pelos elétrons incidentes e os elétrons ejetados pelo material. Maiores profundidades resultam na produção de elétrons com maiores energias cinéticas. (Fonte: IF – UFRGS) .....	56
Figura 36 – Microscópio eletrônico de varredura utilizado. (Fonte: CME – UFPR).....	57
Figura 37 – Diagrama ilustrativo do funcionamento da técnica de espectroscopia de fotoelétrons de raios-x. (Fonte: IF - UFRGS).....	58
Figura 38 – Diagrama representativo dos processos realizados durante o ensaio de identificação dos grupos funcionais. ....	60
Figura 39 – Amostras funcionalizadas (A) e não funcionalizadas (B), subdivididas em pedaços de dimensões semelhantes. ....	61
Figura 40 – Diagrama representativo dos processos de acoplamento dos antígenos às cadeias poliméricas.....	62
Figura 41 – Diagrama do processo de acoplamento de antígenos às microestruturas funcionalizadas. Após o processo de deposição/funcionalização as microestruturas apresentam um terminal funcional acoplado (1). Após a reação com o <i>EDC</i> (2) e Sulfo-NHS (3), realizou-se o acoplamento dos antígenos utilizados (4) e (5). ....	62
Figura 42 – Diagrama ilustrativo de todas as etapas do ensaio de detecção. ....	63
Figura 43 – Microscópio de deconvolução utilizado na análise de fluorescência das amostras. (Fonte – IBMP).....	63
Figura 44 – Diagrama demonstrativo do processo de detecção de anticorpos de HIV, utilizando-se a Ficoeritrina como molécula marcadora. Neste caso, representa-se um resultado positivo para HIV. ....	64
Figura 45 – Distribuição de massas molares obtida por GPC .....	65
Figura 46 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 0,5% de PMMA <i>cast</i> em CLF, com diferentes magnificações. ....	67
Figura 47 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 1,0% de PMMA <i>cast</i> em CLF, com diferentes magnificações. ....	67
Figura 48 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 1,5% de PMMA <i>cast</i> em CLF, com diferentes magnificações. ....	67

Figura 49 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 2,0% de PMMA <i>cast</i> em CLF, com diferentes magnificações. ....	68
Figura 50 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 2,5% de PMMA <i>cast</i> em CLF, com diferentes magnificações. ....	68
Figura 51 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 3,0% de PMMA <i>cast</i> em CLF, com diferentes magnificações. ....	68
Figura 52 – Diâmetro médio dos fios produzidos, de soluções com diferentes concentrações. ....	70
Figura 53 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 0,5% de PMMA <i>cast</i> em DM, com diferentes magnificações. ....	71
Figura 54 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 1,0% de PMMA <i>cast</i> em DM, com diferentes magnificações. ....	71
Figura 55 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 1,5% de PMMA <i>cast</i> em DM, com diferentes magnificações. ....	71
Figura 56 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 2,0% de PMMA <i>cast</i> em DM, com diferentes magnificações. ....	72
Figura 57 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 2,5% de PMMA <i>cast</i> em DM, com diferentes magnificações. ....	72
Figura 58 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 3,0% de PMMA <i>cast</i> em DM, com diferentes magnificações. ....	72
Figura 59 – Diâmetro médio dos fios produzidos, de soluções com diferentes concentrações. ....	74
Figura 60 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 0,5% de PMMA <i>cast</i> em MEC, com diferentes magnificações. ....	75
Figura 61 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 1,0% de PMMA <i>cast</i> em MEC, com diferentes magnificações. ....	75
Figura 62 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 1,5% de PMMA <i>cast</i> em MEC, com diferentes magnificações. ....	75
Figura 63 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 2,0% de PMMA <i>cast</i> em MEC, com diferentes magnificações. ....	76
Figura 64 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 2,5% de PMMA <i>cast</i> em MEC, com diferentes magnificações. ....	76
Figura 65 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 3,0% de PMMA <i>cast</i> em MEC, com diferentes magnificações. ....	76

Figura 66 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 0,5% de PMMA <i>cast</i> em CH, com diferentes magnificações. ....	77
Figura 67 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 1,0% de PMMA <i>cast</i> em CH, com diferentes magnificações. ....	78
Figura 68 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 1,5% de PMMA <i>cast</i> em CH, com diferentes magnificações. ....	78
Figura 69 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 2,0% de PMMA <i>cast</i> em CH, com diferentes magnificações. ....	78
Figura 70 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 2,5% de PMMA <i>cast</i> em CH, com diferentes magnificações. ....	79
Figura 71 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 3,0% de PMMA <i>cast</i> em CH, com diferentes magnificações. ....	79
Figura 72 – Diâmetro médio dos fios produzidos, de soluções com diferentes concentrações. ....	80
Figura 73 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 2,0% de PMMA Sigma em CLF, com diferentes magnificações. ....	82
Figura 74 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 4,0% de PMMA Sigma em CLF, com diferentes magnificações. ....	82
Figura 75 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 6,0% de PMMA Sigma em CLF, com diferentes magnificações. ....	82
Figura 76 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 8,0% de PMMA Sigma em CLF, com diferentes magnificações. ....	83
Figura 77 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 10,0% de PMMA Sigma em CLF, com diferentes magnificações. ....	83
Figura 78 – Diâmetro médio dos fios produzidos, de soluções com diferentes concentrações. ....	85
Figura 79 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 2,0% de PMMA Sigma em DM, com diferentes magnificações. ....	86
Figura 80 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 4,0% de PMMA Sigma em DM, com diferentes magnificações. ....	86
Figura 81 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 6,0% de PMMA Sigma em DM, com diferentes magnificações. ....	86
Figura 82 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 8,0% de PMMA Sigma em DM, com diferentes magnificações. ....	87

Figura 83 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 10,0% de PMMA Sigma em DM, com diferentes magnificações.....	87
Figura 84 – Diâmetro médio dos fios produzidos, de soluções com diferentes concentrações. ....	88
Figura 85 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes da solução com 3,0% de PMMA <i>cast</i> em DM, depositadas pelo método <i>EISA</i> . ....	89
Figura 86 – Ensaio reológico de soluções de PMMA <i>cast</i> /CLF com diferentes concentrações .....	91
Figura 87 – Ensaio reológico de soluções de PMMA <i>cast</i> /DM com diferentes concentrações. ....	94
Figura 88 – Ensaio reológico de soluções de PMMA <i>cast</i> /MEC com diferentes concentrações. ....	96
Figura 89 – Ensaio reológico de soluções de PMMA <i>cast</i> /CH com diferentes concentrações. ....	98
Figura 90 – Ensaio reológico de soluções de PMMA Sigma/CLF com diferentes concentrações. ....	100
Figura 91 – Ensaio reológico de soluções de PMMA Sigma/DM com diferentes concentrações. ....	102
Figura 92 – Espectro da contagem de elétrons pelas respectivas energias de ligação do carbono s1 (Cs1), com resolução de 10 eV. Cada “pico” destacado indica a presença de ligações químicas específicas. ....	104
Figura 93 – Espectro da contagem de elétrons pelas respectivas energias de ligação do carbono s1 (Cs1), com resolução de 10 eV, após deconvolução. Cada “pico” destacado indica a presença de ligações químicas específicas. ....	105
Figura 94 – Imagens de análise de fluorescência em microscópio óptico de deconvolução, nas cores vermelha (a), azul (b), verde (c) e <i>merge</i> (d) .....	107
Figura 95 – Imagens de análise de fluorescência em microscópio óptico de deconvolução, nas cores vermelha (a), azul (b), verde (c) e <i>merge</i> (d) .....	108
Figura 96 – Imagens de análise de fluorescência em microscópio óptico de deconvolução, nas cores vermelha (a), azul (b), verde (c) e <i>merge</i> (d). Amostras produzidas por Eletrofiação, em teste negativo para HIV .....	110
Figura 97 – Imagens de análise de fluorescência em microscópio óptico de deconvolução, nas cores vermelha (a), azul (b), verde (c) e <i>merge</i> (d). Amostras produzidas por Eletrofiação, em teste positivo para HIV .....	111

Figura 98 – Imagens de análise de fluorescência em microscópio óptico de deconvolução, nas cores vermelha (a), azul (b), verde (c) e <i>merge</i> (d). Amostras produzidas por <i>EISA</i> , em teste negativo para HIV .....	112
Figura 99 – Imagens de análise de fluorescência em microscópio óptico de deconvolução, nas cores vermelha (a), azul (b), verde (c) e <i>merge</i> (d). Amostras produzidas por <i>EISA</i> , em teste positivo para HIV .....	113
Figura 100 – Estrutura química do Clorofórmio .....	115
Figura 101 – Estrutura química do Diclorometano .....	116
Figura 102 – Estrutura química da Metiletilcetona .....	117
Figura 103 – Estrutura química da Ciclohexanona .....	118

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades mecânicas e ópticas das chapas de PMMA. (Fonte: MARK <i>et al.</i> , 1996)	23
Tabela 2 – Relação entre concentração da solução utilizada e morfologia das estruturas depositadas.....	33
Tabela 3 – Descrição de todas as soluções produzidas utilizando PMMA <i>cast</i> como soluto. .	46
Tabela 4 – Descrição de todas as soluções produzidas utilizando PMMA Sigma como soluto. ....	47
Tabela 5 – Valores de diferentes massas molares obtidas por <i>GPC</i> , além do índice de polidispersidade. ....	66
Tabela 6 – Valores de diâmetro médio dos fios depositados, em função da concentração de PMMA <i>cast</i> , com CLF como solvente. ....	69
Tabela 7 – Valores de diâmetro médio dos fios depositados, em função da concentração de PMMA <i>cast</i> , com DM como solvente. ....	73
Tabela 8 – Valores de diâmetro médio dos fios depositados, em função da concentração de PMMA <i>cast</i> , com CH como solvente. ....	80
Tabela 9 – Valores de diâmetro médio dos fios depositados, em função da concentração de PMMA Sigma, com CLF como solvente. ....	84
Tabela 10 – Valores de diâmetro médio dos fios depositados, em função da concentração de PMMA Sigma, com DM como solvente. ....	88
Tabela 11 – Valores de diâmetro médio dos fios de PMMA <i>cast</i> depositados através da técnica <i>EISA</i> . Concentração mássica de polímero de 3,0%, Diclorometano como solvente.....	90
Tabela 12 – Valores de viscosidade de diferentes soluções de PMMA <i>cast</i> /CLF .....	93
Tabela 13 – Valores de viscosidade de diferentes soluções de PMMA <i>cast</i> /DM. ....	95
Tabela 14 – Valores de viscosidade de diferentes soluções de PMMA <i>cast</i> /MEC.....	97
Tabela 15 – Valores de viscosidade de diferentes soluções de PMMA <i>cast</i> /CH. ....	99
Tabela 16 – Valores de viscosidade de diferentes soluções de PMMA Sigma/CL.F. ....	101
Tabela 17 – Valores de viscosidade de diferentes soluções de PMMA Sigma/DM. ....	102
Tabela 18 – Áreas do gráfico 14 correspondentes ao número (e tipos) de ligações químicas presentes no polímero.....	106
Tabela 19 – Propriedades/características do clorofórmio.....	115
Tabela 20 – Propriedades/características do Diclorometano.....	116
Tabela 21 – Propriedades/características da Metiletilcetona.....	117



Tabela 22 – Propriedades/características do Ciclohexanona.....	118
--	-----

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	21
<b>1.1. POLI (METIL METACRILATO)</b> .....	21
1.1.1. PMMA <i>CAST</i> .....	22
1.1.2. PMMA SIGMA .....	25
<b>1.2. ELETROFIAÇÃO</b> .....	26
1.2.1. BREVE HISTÓRICO .....	28
1.2.2. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO.....	30
1.2.3. PARÂMETROS INFLUENCIADORES NA MORFOLOGIA DAS ESTRUTURAS DEPOSITADAS .....	32
1.2.4. APLICAÇÕES DA TÉCNICA.....	35
1.2.5. FIOS/MEMBRANAS DE PMMA DEPOSITADAS POR ELETROFIAÇÃO .....	37
<b>1.3. ELETROSPRAY COM ATIVAÇÃO SUPERFICIAL INDUZIDA (EISA)</b> .....	38
1.3.1. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO.....	39
1.3.2. APLICAÇÃO DA TÉCNICA .....	41
<b>2. OBJETIVOS</b>	43
2.1. GERAIS.....	43
2.2. ESPECÍFICOS .....	43
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	44
3.1. POLÍMEROS E SOLVENTES .....	44
3.2. ADITIVOS PARA SOLUÇÃO ELETROLÍTICA DE ATIVAÇÃO .....	44
3.3. REAGENTES PARA ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	45
3.4. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS.....	45
3.4.1. PMMA <i>CAST</i> COMO SOLUTO .....	45
3.4.2. PMMA SIGMA COMO SOLUTO.....	47
3.5. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO ELETROLÍTICA DE ATIVAÇÃO .....	47

<b>3.6. DEPOSIÇÕES</b>	48
3.6.1. ELETROFIAÇÃO TRADICIONAL	48
3.6.2. ELETROFIAÇÃO COM ATIVAÇÃO SUPERFICIAL INDUZIDA ( <i>EISA</i> )	50
<b>3.7. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO</b>	52
3.7.1. CROMATOGRAFIA DE PERMEACÃO EM GEL ( <i>GPC</i> )	52
3.7.2. REOLOGIA	53
3.7.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA ( <i>MEV</i> )	54
3.7.4. ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS EXCITADOS POR RAIOS-X ( <i>XPS</i> )	57
3.7.5. ENSAIOS DE IDENTIFICAÇÃO/CONFIRMAÇÃO DO GRUPO FUNCIONAL	58
3.7.6. ENSAIOS DE DETECÇÃO DE ANTICORPOS DE HIV	61
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	65
4.1. MASSA MOLAR DOS POLÍMEROS	65
4.1.1. PMMA <i>CAST</i>	65
4.1.2. PMMA SIGMA	66
4.2. MORFOLOGIA DAS ESTRUTURAS DEPOSITADAS	66
4.2.1. PMMA <i>CAST</i> DEPOSITADO POR ELETROFIAÇÃO	66
4.2.2. PMMA SIGMA DEPOSITADO POR ELETROFIAÇÃO	81
4.2.3. PMMA <i>CAST</i> DEPOSITADO POR <i>EISA</i>	89
4.3. VISCOSIDADE DAS SOLUÇÕES	91
4.3.1. PMMA <i>CAST</i> COMO SOLUTO	91
4.3.2. PMMA SIGMA COMO SOLUTO	99
4.4. ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS EXCITADOS POR RAIOS-X ( <i>XPS</i> )...	103
4.4 ENSAIOS DE IDENTIFICAÇÃO/CONFIRMAÇÃO DO GRUPO FUNCIONAL	107
4.5. ENSAIOS DE DETECÇÃO DE ANTICORPOS DE HIV	109
4.5.1. AMOSTRAS DEPOSITADAS POR ELETROFIAÇÃO TRADICIONAL	109

4.5.2. AMOSTRAS DEPOSITADAS POR ELETROFIAÇÃO FUNCIONALIZANTE (EISA).....	111
<b>5. CONCLUSÃO</b>	114
<b>6. ANEXO I</b>	115
6.1. CLOROFÓRMIO.....	115
6.2. DICLOROMETANO .....	116
6.3. METILETILCETONA .....	117
6.4. CICLOHEXANONA.....	118
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	120

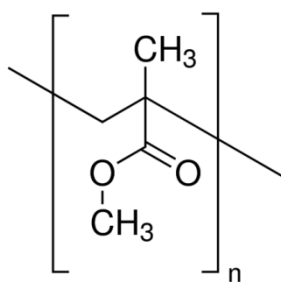
## 1. INTRODUÇÃO

Materiais poliméricos microestruturados mostram-se extremamente promissores em diversas áreas do conhecimento, tais como química, biologia e engenharia e ciência de materiais. Dentre as aplicações mais promissoras destacam-se sensores químicos e biológicos, capazes de realizar a detecção de líquidos e gases nocivos, além de doenças em amostras sanguíneas (RAMAKRISHNA, 2013).

Neste trabalho é estudada a produção e caracterização de microestruturas de Poli (metil metacrilato) superficialmente funcionalizadas, utilizando técnicas e procedimentos de alta precisão e baixo custo. Para o melhor entendimento das atividades realizadas, uma breve abordagem acerca dos polímeros utilizados é realizada a seguir, dando destaque para características específicas de cada material, além de suas respectivas aplicações. Esta abordagem é essencial para entender a escolha de cada polímero, além das diferenças práticas entre si. Em seguida apresentam-se as técnicas de deposição utilizadas neste trabalho, destacando os princípios de funcionamento e as características específicas de cada uma. A fim de ilustrar a importância das mesmas, seguem exemplos de aplicações de alta tecnologia envolvendo os polímeros utilizados neste trabalho, depositados pelas mesmas técnicas de deposição aqui abordadas.

### 1.1. POLI (METIL METACRILATO)

O Poli (metil metacrilato) (PMMA) é um polímero orgânico de cadeia linear, com ligação entre monômeros através de ligações covalentes entre carbonos saturados. Este polímero, conforme apresentado na figura 1, apresenta grupos metila e carbonila em sua estrutura (YOUNG, 1992).



**Figura 1 – Representação de uma unidade de repetição (monômero) da cadeia polimérica do PMMA.**

(Fonte: Sociedade Brasileira de Química)

Produzido pela primeira vez por William Chalmers, Otto Röhm e Walter Bauer, em 1928, este polímero foi primeiramente industrializado em 1933 pela empresa Rohm & Haas®, com o nome comercial de Acryloid®, depois modificado para Plexiglass® (HORN, 1960).

Algumas características do PMMA podem ser observadas em todas as formas do material, independente do processo de polimerização utilizado. São elas: alta termoplasticidade, insolubilidade em água, solubilidade em solventes orgânicos, boa resistência a intempéries naturais, alta rigidez dielétrica, baixa densidade, biocompatibilidade, dentre outras (CALLISTER, 2013). Entretanto, especial atenção deve ser dada às diferentes técnicas de polimerização para a produção de PMMA. A escolha da técnica adequada é decisiva para a obtenção de um produto com características específicas. Atualmente este polímero é costumeiramente produzido através de duas técnicas de polimerização por adição: em massa (*bulk*, em inglês) e em solução, ambas via radicais livres.

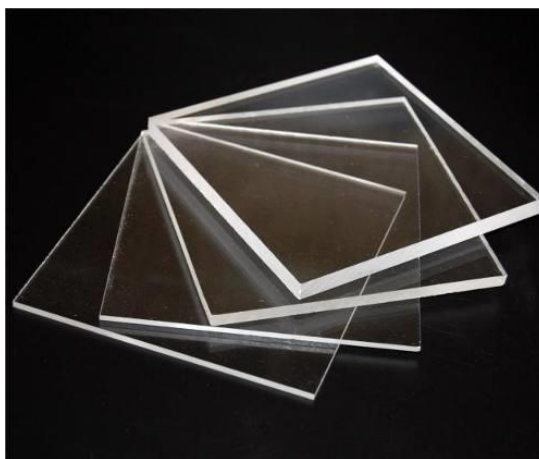
#### 1.1.1. PMMA CAST

Na técnica de polimerização em massa, quando a moldagem do material ocorre simultaneamente com a polimerização, o processo leva o nome de *cell casting* (HORN, 1960). Este tipo de polimerização utiliza o monômero metil metacrilato (MMA) em mistura com um iniciador químico, um catalisador e diversos aditivos. O composto químico frequentemente utilizado como iniciador do processo de polimerização é o peróxido de benzoíla, representando entre 0,01% e 0,5% do total em massa. Como o nome sugere, este iniciador se faz necessário para dar início ao processo de quebra das cadeias laterais dos monômeros, para propiciar a futura ligação entre os mesmos. O composto químico utilizado como catalisador na produção de PMMA é a azobisisobutironitrila, na proporção entre 0,01% a 1,0% em massa do total. Este composto orgânico é vital para que o processo de polimerização aconteça em tempo hábil, haja visto que com a ausência do mesmo o processo que leva algumas horas não pode ser finalizado antes de algumas semanas ou até mesmo meses (HORN, 1960). Dentre os aditivos utilizados estão o ácido metacrílico (precursor do PMMA, representando 0,1% em massa do total), o ácido esteárico (agente lubrificante, 0,1% em massa do total) e o dibutilftalato (propiciador de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas, 3% a 4% em massa do total). Esta mistura é então despejada em uma forma prensada de vidro temperado, que serve já como molde nas medidas desejadas, e submetida a ciclos de aquecimento e resfriamento que podem durar entre 6 e 24 horas, dependendo das dimensões do produto desejado. Durante este processo a temperatura varia de 40 °C a 120 °C, e seu monitoramento é vital para garantir a produção de

chapas com altos valores de massa molar, baixa densidade, alta resistência ao impacto e tração, boa resistência a intempéries naturais (como umidade, radiação e temperatura), alta transmitância em todo o espectro do visível, além de boa transmitância no espectro do ultravioleta (tabela 1). Um exemplo de chapas acrílicas produzidas por esta técnica pode ser observado na figura 2.

**Tabela 1 – Propriedades mecânicas e ópticas das chapas de PMMA. (Fonte: MARK *et al.*, 1996)**

Massa molar	$> 1,0 \times 10^6$ g/mol
Módulo de elasticidade	2,24 GPa a 3,24 GPa
Limite de resistência à tração	48,3 MPa a 72,4 MPa
Limite de escoamento	53,8 MPa a 73,1 MPa
Alongamento na ruptura	2,0% a 5,5%
Densidade	$1,17 \text{ g/cm}^3$ a $1,20 \text{ g/cm}^3$
Transmitância (espectro visível)	78% a 92%
Temperatura de transição vítrea	105 °C a 120 °C



**Figura 2 – Chapas translúcidas de PMMA de diferentes espessuras. (Fonte: Acridam)**

#### 1.1.1.1. UTILIZAÇÕES

As propriedades ópticas e mecânicas previamente citadas, associadas à uma alta estabilidade química, permitem que o PMMA *cast* substitua o vidro em diversos casos, seja na produção de janelas e peças decorativas, ou na fabricação de estruturas transparentes para utilização em aviões e helicópteros (HORN, 1960), conforme pode ser observado na figura 3.



**Figura 3 – Utilização de chapas de PMMA na construção de helicópteros. (Fonte: Divulgação)**

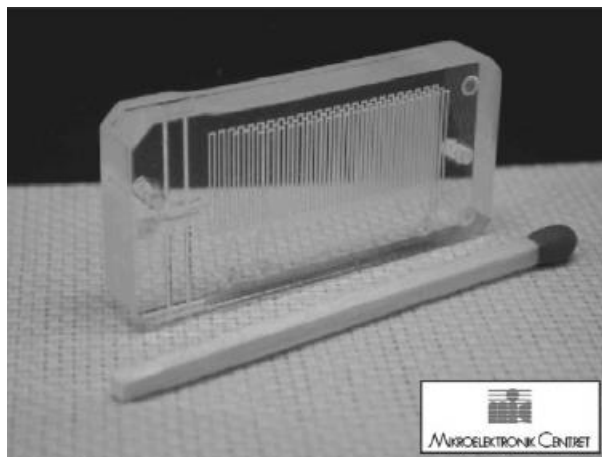
Graças à satisfatória transmissão de radiação ultravioleta observada nas chapas de PMMA *cast* (ao contrário dos vidros comerciais, tipicamente opacos nesta faixa do espectro óptico), esta técnica de polimerização é utilizada também na produção de equipamentos utilizados em instrumentação óptica, como lentes e guias de onda (HORN, 1960). Na figura 4 temos exemplos de lentes deste material.



**Figura 4 – Lentes de PMMA *cast* utilizadas em instrumentação óptica. (Fonte: Divulgação)**

As chapas de PMMA são frequentemente utilizadas na construção de dispositivos microfluídicos. Como exemplo temos os dispositivos *lab-on-a-chip* (termo que denota um laboratório contido em um chip, do inglês) (KLANK *et al.*, 2002 e RAHAL *et al.*, 2013). Um exemplo de dispositivo microfluídico de PMMA é demonstrado na figura 5.





**Figura 5 – Chapas de PMMA *cast* sendo utilizadas em dispositivos micro fluídicos**

(Fonte: KLANK *et al.*, 2002)

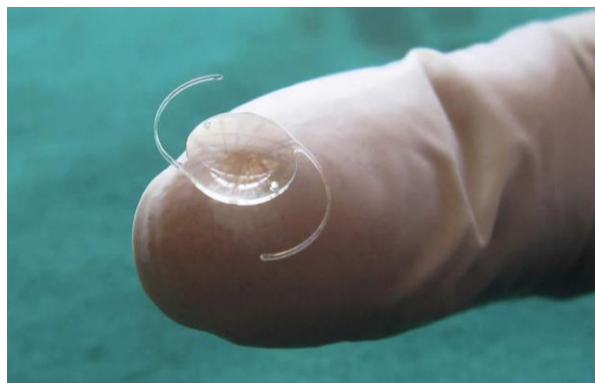
### 1.1.2. PMMA SIGMA

A técnica de polimerização em solução, por sua vez, é amplamente utilizada na produção de PMMA com valores de massa molar entre 30.000 g/mol e 1.000.000 g/mol. Diferentemente do processo de *cell casting*, esta técnica não permite que a moldagem do material ocorra simultaneamente com o processo de polimerização. O polímero é produzido em forma granulada ou em pó.

#### 1.1.2.1. UTILIZAÇÕES

Nesta apresentação o PMMA é tradicionalmente empregado como aditivo químico nos mais diversos ramos da indústria. Graças às características anteriormente citadas, o PMMA é utilizado na fabricação de tintas acrílicas de uso externo de alto desempenho, isto é, que necessitam de maior resistência física e química. Frequentemente este material é utilizado também na fabricação de tintas aplicadas à fuselagem de aviões, por suportar condições de temperatura e pressão adversas.

Graças às excelentes propriedades ópticas e mecânicas deste polímero, associadas à sua característica de biocompatibilidade, o PMMA passou a ser utilizado em diversas aplicações ligadas à biotecnologia e à biomedicina. Dentre elas, destaca-se a utilização de lentes de PMMA em substituição às córneas danificadas de pacientes que sofrem de catarata (MEYERS, 1995), conforme demonstrado na figura 6.



**Figura 6 – Lente de PMMA utilizada na substituição de córneas. (Fonte: Cornealring)**

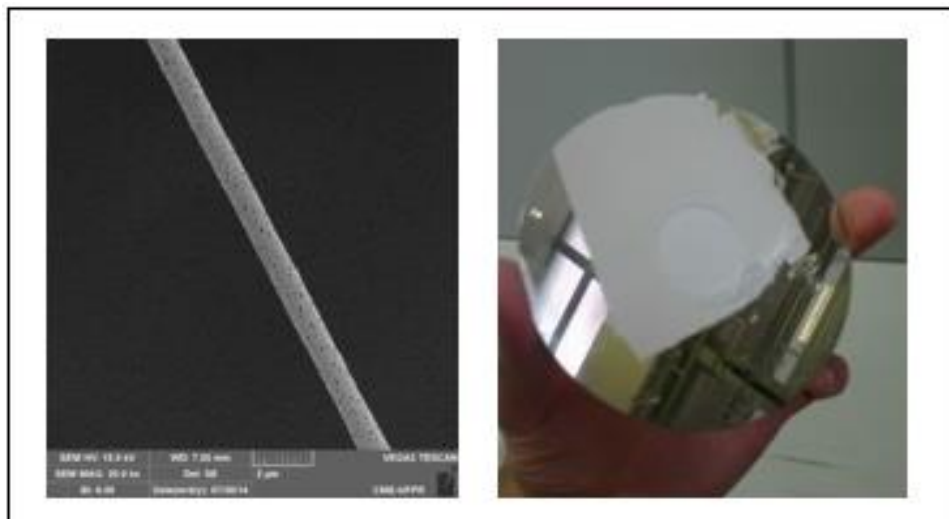
Outra aplicação biomédica que merece destaque é o uso deste polímero em cimentações ósseas. Pacientes que sofrem fraturas ósseas frequentemente necessitam reconstruir cirurgicamente tais ossos com uma massa cujo principal componente é o PMMA (RHO, 1993).



**Figura 7 – Radiografia com um exemplo de PMMA utilizado em cimentação óssea. (Fonte: Ijoonline)**

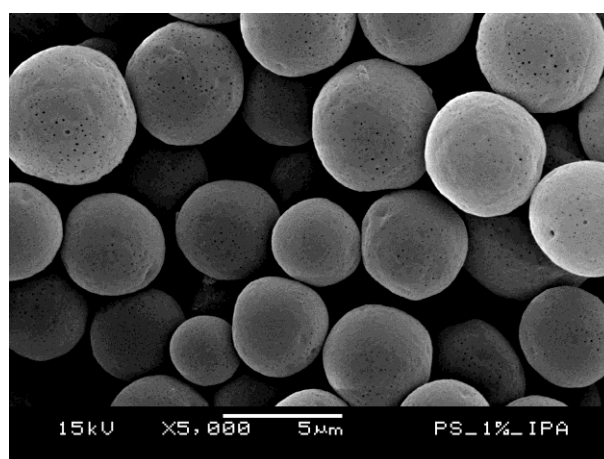
## **1.2. ELETROFIAÇÃO**

A técnica de deposição por Eletrofiação (*electrospinning*, em inglês) permite a produção de fios, hastes e bastões poliméricos com dimensões nano/micrométricas. Quando utilizada continuamente durante longos períodos (minutos ou horas, dependendo do material) podem ser obtidas membranas com espessuras de dezenas de micrômetros, através da sobreposição dos fios depositados, conforme pode ser observado na figura 8.



**Figura 8 – Exemplos de estruturas depositadas pela técnica de Eletrofiação, por 10 min (à esquerda, micrografia eletrônica de varredura) e por 2 horas (à direita) (Fonte: Acervo do autor)**

Conforme será posteriormente discutido, quando alguns parâmetros críticos são alterados pode-se produzir também partículas de diferentes formas, dentre elas esferas/esferoides (*spheres* ou *beads*, em inglês) demonstradas na figura 9. As dimensões destas partículas podem variar de aproximadamente centenas de nanômetros até dezenas de micrometros. Quando a produção destas estruturas é observada, a técnica de deposição é nomeada Eletrospray (do inglês, *Electrospray*).



**Figura 9 – Micrografia eletrônica de varredura de microesferas de Poliestireno (Fonte: Acervo Laboratório de Inovação em Tecnologia de Sensores da UFPR)**

Embora seja possível imaginar que esta técnica seja relativamente nova, graças às dimensões reduzidas das estruturas produzidas, veremos a seguir que a origem do princípio de deposição data do século XIX.

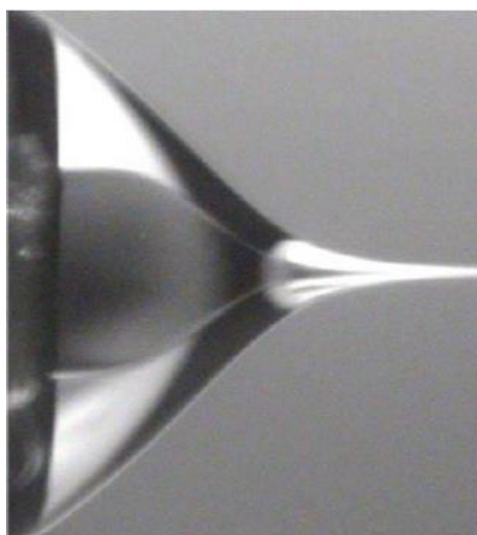
### 1.2.1. BREVE HISTÓRICO

Embora uma das características mais importantes da técnica de deposição por Eletrofiação seja a simplicidade do aparato experimental, o processo de aperfeiçoamento e de compreensão sobre os fenômenos físicos envolvidos no processo se prolongou por várias décadas. O início deste processo é creditado a John William Strutt, mais conhecido como Lorde Rayleigh. Em 1882 este nobre inglês dedicou especial atenção ao comportamento de líquidos quando expostos a elevados campos elétricos. Rayleigh observou experimentalmente que a injeção e/ou indução de cargas elétricas em tais líquidos acabava por forçar o deslocamento dos mesmos, devido à força coulombiana existente pela presença do forte campo elétrico na região. Quando estes líquidos estavam aprisionados em aparatos semelhantes a seringas metálicas, observava-se a ejeção dos mesmos destes aparatos. O desenvolvimento de técnicas de ejeção de líquidos baseados em campos elétricos continuou a ser desenvolvido, de tal maneira que no início do século XX alguns equipamentos ainda primitivos foram patenteados, porém sem nenhuma aplicação definida (COOLEY, 1900 e 1902), (MORTON, 1902).

Já em 1914, John Zeleny observou que quando campos elétricos suficientemente intensos são aplicados, pode se observar o rompimento do filamento ejetado em pequenas gotas. Esse comportamento foi creditado ao fato da força coulombiana experimentada pelo líquido ser grande o suficiente a ponto de romper a tensão superficial do líquido ejetado. Credita-se também a Zeleny, a primeira tentativa de modelagem do comportamento de fluidos quando expostos a campos elétricos intensos e, consequentemente, expostos a forças colombianas. Formals Anton, em uma patente de 1934, demonstrou a possibilidade de produzir fios de acetato de celulose utilizando os princípios da técnica de Eletrofiação. Este trabalho se destaca por demonstrar, pela primeira vez, a possibilidade de produção de estruturas poliméricas através desta técnica de deposição. Isso permitiu que outros polímeros passassem a ser depositados por Eletrofiação (ANTON, 1934 e 1939).

Embora o processo básico de funcionamento da técnica de deposição por Eletrofiação já fosse bem conhecido na década de 1950, alguns aspectos mais específicos ainda eram alvos de discussão. Tanto os mecanismos de separação do polímero do solvente, quanto a evaporação deste durante o processo de deposição não estavam muito bem explicados. Em 1964 Geoffrey

Ingram Taylor investigou os mecanismos de desintegração de gotas de água através da aplicação de campos eletrostáticos intensos. Esta situação, na verdade, se mostrava idêntica à observada durante o processo de deposição por Eletrofiação, no momento em que a solução deixava o capilar metálico. Taylor demonstrou, teórica e experimentalmente, que o filamento na ponta do capilar só acaba por ser rompido quando o mesmo apresenta um ângulo semi-vertical de  $49,3^\circ$ . Esta situação só é alcançada quando este filamento (em forma de cone) acaba por acumular cargas elétricas suficientes para que a repulsão elétrica consiga romper a tensão superficial do líquido em questão. Além de tais considerações práticas, pela primeira vez um modelo teórico conseguiu representar o funcionamento da deposição por Eletrofiação, levando em conta a contribuição de características físico-químicas da solução, além do campo eletrostático (TAYLOR, 1964 e 1967). Graças às suas importantes contribuições, o cone formado após a ejeção da solução do capilar foi batizado com o seu nome (cone de Taylor), que pode ser observado na figura 10.



**Figura 10- Fotografia de estrutura denominada cone de Taylor**  
(Fonte: TAYLOR, 1964)

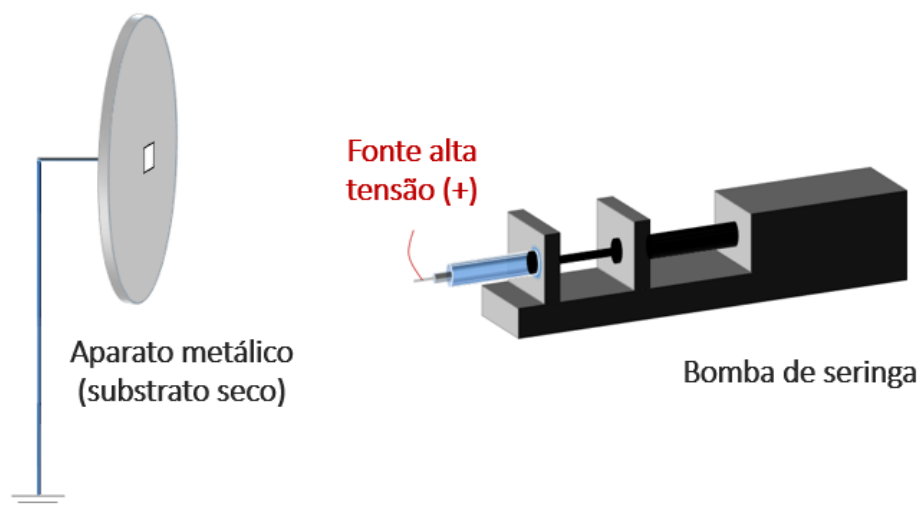
Com o aumento da popularidade da técnica de deposição, outros polímeros mostraram-se passíveis de deposição por Eletrofiação. Além de estruturas micrométricas, fios com diâmetros nanométricos de resinas acrílicas foram depositados (BAUMGARTEN, 1971). Entretanto, devido à limitação tecnológica da época não foi possível a caracterização morfológica mais precisa das estruturas produzidas. Este problema, inclusive, foi o responsável pelo desuso desta técnica na produção de materiais nanométricos até a década de 1990. Somente após a

popularização da microscopia eletrônica a técnica de deposição por Eletrofiação voltou a ser foco de estudo na produção de materiais de dimensões nano/micrométricas.

Até a presente data mais de 50 polímeros, tanto sintéticos quanto naturais, já foram depositados por Eletrofiação e/ou Eletrospray (DAYAL *et al*, 2007). A crescente popularização desta técnica justifica-se, em grande parte, pela simplicidade do aparato experimental, baixo custo de produção, e elevado controle sobre a morfologia das estruturas produzidas. Com isso, pode-se observar a utilização da técnica em pesquisas nas áreas de física, química, biologia, engenharia e ciência de materiais, dentre muitas outras (RAMAKRISHNA *et al.*, 2006).

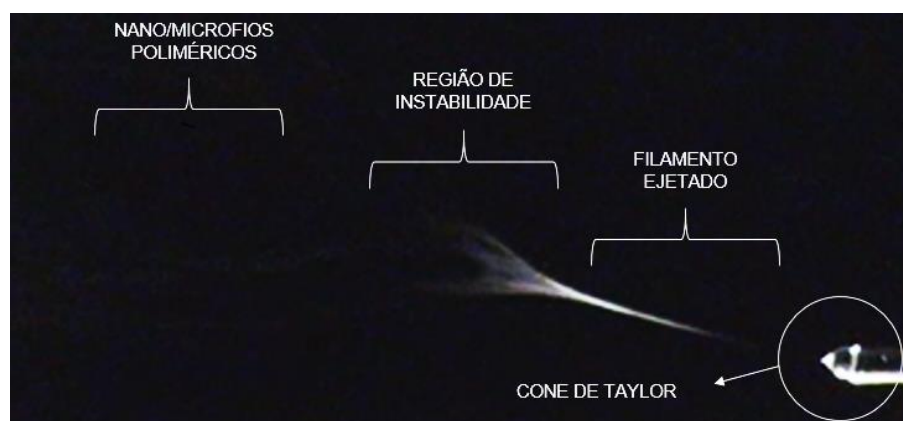
### 1.2.2. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

Embora pequenas diferenças entre os aparatos experimentais sejam observadas, o princípio de funcionamento da deposição por Eletrofiação baseia-se na utilização de um campo elétrico da ordem de kV/cm entre um capilar metálico contendo um polímero solubilizado/suspenso e um substrato, aqui utilizado como alvo. Geralmente a solução/suspensão é contida em uma seringa de vidro, na qual é acoplada uma agulha metálica com a extremidade cortada, a fim de garantir uma secção cilíndrica reta. Este conjunto é então montado em uma bomba de seringa, cuja função é garantir uma vazão constante na faixa de microlitros por minuto. O campo elétrico, por sua vez, é garantido pela ligação do terminal positivo de uma fonte elétrica de alta tensão na agulha (que agirá neste caso como um capilar metálico) e o terminal negativo no porta-amostra que está ligado ao terra. Um diagrama representativo do aparato experimental é demonstrado na figura 11.



**Figura 11 – Diagrama representativo do aparato experimental da técnica de deposição por Eletrofição/Eletrospray. Um disco aterrado de alumínio é aqui utilizado como alvo.**  
(Fonte: acervo do autor)

O que se observa é uma forte ionização das moléculas da solução contida na seringa, que acabam por experimentar uma forte atração coulombiana. Isso culmina na ejeção desta solução através do capilar metálico, em direção ao substrato. Durante este voo, entretanto, uma forte instabilidade termodinâmica é observada (MEGELSKI *et al.*, 2002), o que acaba por induzir a separação de fase entre o polímero e o solvente, provocando assim a evaporação deste (LI, 2014). Observa-se então a deposição de estruturas poliméricas, de dimensões nano/micrométricas.



**Figura 12 – Imagem do processo de ejeção da solução e consequente separação de fase entre o polímero e o solvente. Graças às dimensões dos fios produzidos é impossível reconhecê-los na imagem.**  
(Fonte: Acervo do Laboratório de Inovação em Tecnologia de Sensores da UFPR)

### 1.2.3. PARÂMETROS INFLUENCIADORES NA MORFOLOGIA DAS ESTRUTURAS DEPOSITADAS

Embora o processo de deposição por Eletrofiação seja fundamentalmente simples, o controle e análise de determinados parâmetros (tanto do aparato quanto da solução utilizada) são fundamentais para o completo controle da morfologia das estruturas produzidas (MEGELSKI *et al.*, 2002 e DAYAL *et al.*, 2007).

#### 1.2.3.1. MASSA MOLAR DO POLÍMERO

Como o próprio nome sugere, massa molar de um polímero corresponde à massa de um mol de moléculas deste material. Intrinsecamente, esta grandeza física carrega também a informação sobre o tamanho das cadeias poliméricas. Na técnica de deposição por Eletrofiação este parâmetro influi diretamente na morfologia das estruturas produzidas, de modo que um valor mínimo é necessário para que a deposição ocorra. De maneira geral, mantendo a concentração constante, quanto maior a massa molar do polímero solubilizado, maiores as dimensões e a porosidade das estruturas produzidas (FANTINI *et al.*, 2006). Por outro lado, essa característica permite a utilização de uma menor concentração de um polímero de maior massa molar para produzir as mesmas estruturas, o que acaba por influenciar diretamente na eficiência e no custo envolvido na produção dos materiais.

#### 1.2.3.2. CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO

A concentração de uma solução se refere à quantidade de soluto em relação ao solvente utilizado, ou em relação à solução. Pode ser expressa em volume por volume, massa por volume ou massa por massa.

Sabe-se que um aumento na concentração de uma solução polimérica acarreta em um aumento na viscosidade da mesma. Assim, para que ocorra a formação do cone de Taylor (e consequentemente uma deposição estável), valores mínimos de viscosidade devem ser alcançados. Entretanto, não é possível traçar uma regra acerca deste valor mínimo, haja visto que para cada solução uma viscosidade mínima é necessária. Sabe-se também que a concentração da solução influi diretamente na morfologia das estruturas depositadas. Assim, para cada conjunto soluto/solvente observam-se valores diferentes de concentração mínima, intermediária e máxima. A concentração da solução utilizada influi também no tamanho das estruturas depositadas. Logo, em concentrações pouco maiores de que a mínima um pequeno



aumento na quantidade de soluto acarreta na deposição de partículas/esferas com diâmetros maiores. Esta mesma característica pode ser observada em todas as faixas de concentração (MEGUELSKI *et al.*, 2002), e está resumidamente exposta na tabela 2. É importante ressaltar, entretanto, que a definição do que seriam as concentrações “mínimas”, “intermediárias”, e “máximas” deve ser avaliada experimentalmente, de acordo com a morfologia das estruturas produzidas, para cada conjunto polímero-solvente.

**Tabela 2 – Relação entre concentração da solução utilizada e morfologia das estruturas depositadas.**

<b>Concentração da solução</b>	<b>Estruturas depositadas</b>
“Mínima”	Partículas, esferas
“Intermediária”	Esferas, fios e fios com esferas
“Máxima”	Fios

Indiretamente, esta característica acaba por influenciar também na porosidade destas estruturas. Via de regra, quando comparamos soluções com o mesmo polímero como soluto (com massas molares idênticas), maiores concentrações implicam em maiores porosidades. Isso ocorre pois quanto maior a quantidade de soluto, maior será o efeito da separação de fase entre polímero e solvente, o que desencadeia a produção de poros com maiores dimensões (MEGUELSKI *et al.*, 2002 e DAYAL *et al.*, 2007). Este efeito de separação de fase está intrinsecamente ligado à pressão de vapor do solvente utilizado (LI, 2014).

#### 1.2.3.3. PRESSÃO DE VAPOR DO SOLVENTE

Em um recipiente fechado, podemos aferir a pressão de um determinado vapor que está em equilíbrio termodinâmico com o líquido que lhe deu origem. Esta medida nos fornece a pressão de vapor deste líquido (SWALIN, 1967). Esta grandeza física carrega consigo a informação do grau de volatilidade de um determinado solvente. Assim, quanto maior a pressão de vapor de um líquido, maior a sua volatilidade.

Durante o processo de separação de fase entre o polímero e o solvente, na técnica de deposição por Eletrofiação, quanto maior a pressão de vapor do solvente, maior o tamanho médio de poro na superfície das estruturas depositadas (DAYAL *et al.*, 2007). Isto ocorre pois quando a volatilidade do solvente é muito elevada a evaporação do mesmo ocorre muito rapidamente, deixando “buracos” na superfície do polímero, enquanto este viaja até o substrato (LI, 2014).

#### 1.2.3.4. TENSÃO ELÉTRICA

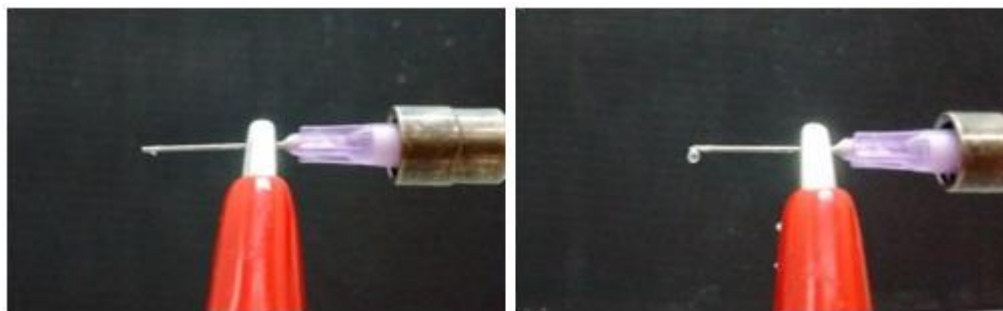
Conforme discutido anteriormente, o valor da tensão deve ser suficiente para que ocorra a formação do cone de Taylor e, portanto, a deposição. Caso este parâmetro seja extrapolado nenhuma estrutura será depositada. Observa-se também que o aumento da tensão, quando todos os outros parâmetros experimentais são mantidos constantes, acarreta em uma pequena diminuição no tamanho médio das estruturas. Isso é facilmente justificado quando lembramos que a tensão tem relação direta com a ionização da solução (e consequentemente com a força elétrica experimentada por esta). Na prática, entretanto, este parâmetro acaba sendo ajustado “em sintonia” com a taxa de vazão da solução, para se obter um processo homogêneo de deposição. Nenhuma influência direta na porosidade é associada a variações na tensão (PARK *et al.*, 2009 e MEGUELSKI *et al.*, 2002). Com isso, o valor da tensão elétrica utilizada usualmente varia entre 5 kV e 20 kV.

#### 1.2.3.5. DISTÂNCIA ATÉ O SUBSTRATO

Como o aumento da distância entre o capilar metálico, (ligado ao terminal positivo da fonte) e o substrato aterrado acarreta na diminuição do campo elétrico observado, este parâmetro acaba por influir diretamente na formação do cone de Taylor. Além disso, a distância até o substrato tem que ser suficiente para que a evaporação do solvente ocorra totalmente, caso contrário o substrato acabará “molhado”, prejudicando completamente a morfologia das estruturas depositadas (PARK *et al.*, 2009).

#### 1.2.3.6. TAXA DE VAZÃO

A taxa de vazão é definida pela razão entre o volume da solução ejetada através do capilar metálico e o tempo transcorrido, e é geralmente provida por uma bomba de seringa. Em deposições por Eletrofiação este parâmetro usualmente se encontra na faixa de microlitros por minuto ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ). A vazão de solução através do capilar metálico deve ser suficiente para que, com a existência do campo elétrico, o cone de Taylor possa ser formado e a solução ejetada (TAYLOR, 1967 e WANG *et al.*, 2009). Se a taxa for baixa demais em poucos segundos a deposição será interrompida. Todavia, se um excesso de vazão for observado, teremos a ausência do cone de Taylor seguido de gotejamento (figura 13).



**Figura 13 –Imagens do processo de ejeção da solução, exemplificando a utilização de taxas de vazão insuficiente e excessiva, respectivamente. (Fonte: Acervo do autor)**

Assim, é possível perceber que este parâmetro tem forte relação com o campo elétrico utilizado, sendo que ambos devem ser ajustados simultaneamente para que a deposição ocorra homogeneamente. Além disso, o aumento da taxa de vazão implica na deposição de estruturas com maiores dimensões e maior porosidade (MEGUELSKI *et al.*, 2002).

#### 1.2.4. APLICAÇÕES DA TÉCNICA

Micro/nanofios de ácido poliglicólico (PGA), ácido poli-L-lático (PLLA) e ácido poli-lático-co-glicólico (PGLA) depositados por Eletrofiação/Eletrospray, e posteriormente funcionalizados por plasma de oxigênio para enxerto de ácido acrílico (AA) foram produzidos (PARK *et al.*, 2007). Graças ao caráter biodegradável do material, bem como pela presença de grupos carboxílicos provenientes da funcionalização, tais fios mostraram-se excelentes substratos para cultura de fibroblastos. A grande área superficial do material, inclusive, proveu excelente adesão à cultura de células. Estes resultados mostram o grande potencial do material na mimetização da matriz celular humana (PARK *et al.*, 2007).

Embora a utilização de polímeros biodegradáveis em biomateriais já seja amplamente difundida, o controle preciso da taxa de degradação destes materiais pode ser um desafio (YOO, *et al.*, 2009). A utilização de materiais inorgânicos, como a hidroxiapatita (Hp) por exemplo, mostra-se como uma interessante ferramenta no controle da degradação de fios nanométricos de PLLA depositados por Eletrofiação. Quanto maior a proporção de Hp em relação ao polímero, menor o caráter hidrofílico do material, o que resulta em uma menor taxa de degradação (LUONG *et.al.*, 2008).

A grande área superficial das fibras nanométricas permite um grande acoplamento de nanopartículas na mesma. Isso permite que fibras de Nylon® 6, por exemplo, atuem como um eficiente suporte para nano-partículas de prata. Membranas com esta composição, depositadas

por Eletrofiação, mostram-se como superfícies não contaminantes com um forte caráter bactericida (DONG *et al.*, 2008). A mesma técnica de produção pode ser utilizada para acoplar fármacos à superfície das fibras. Dependendo da preparação química, é possível produzir um composto que apresenta alta taxa de degradação em ambientes ácidos, e uma baixa (ou nenhuma) taxa em ambientes alcalinos. Esta característica é extremamente promissora para utilização destes materiais em *drug delivery* (expressão em inglês que denota entrega localizada e controlada de medicamentos em ambiente intracorpóreo). Em outros trabalhos também é relatado o aprisionamento de fármacos no interior de fibras com taxa de degradação controlada. (YOO, *et al.*, 2009).

Polímeros com memória de forma (*SMP*, acrônimo em inglês) também já foram depositados com sucesso, por Eletrofiação. Fibras de poliuretano com diâmetros nanométricos foram produzidas, e apresentaram 98% de recuperação de forma durante um ciclo. Tais características garantem um enorme potencial de aplicação medicinal, como *stents* vasculares, reparadores de hérnias, entre outros (RAMAKRISHNA, 2006).

Graças à possibilidade do controle da morfologia das fibras, bem como da disposição das mesmas quando formam membranas, é possível produzir filtros com porosidade altamente controlada. Assim, estes filtros mostram alta eficácia (~100%) na retirada de material particulado com diâmetro médio entre 1  $\mu\text{m}$  e 5  $\mu\text{m}$ , suspenso em ar atmosférico (GIBSON *et al.*, 2001). Já na filtração de água, observou-se a remoção de partículas com diâmetro médio entre 3  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$  com 95 % de eficiência. Além disso, se constatou que durante a filtração o fluxo não sofre nenhuma alteração considerável (RAMAKRISHNA, 2006).

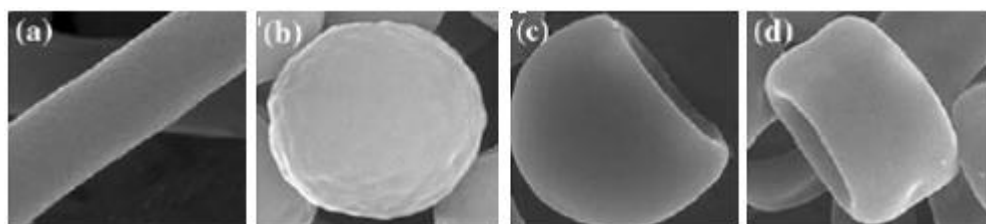
Além do processo físico de captura de partículas, as membranas depositadas por Eletrofiação podem ainda realizar a captura de moléculas alvo (proteínas, antígenos, grupos funcionais) através de adsorção química. Para isso, o polímero utilizado deve apresentar determinada afinidade química intrínseca, ou ser funcionalizado para tal. Dentre os inúmeros exemplos disponíveis (YOO *et al.*, 2009), a captura de proteínas imunoglobina G (IgG) por membranas de celulose funcionalizadas com proteína A/G merece destaque. Enquanto as membranas comerciais apresentam 80  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de captura, membranas compostas por nano-fios de celulose depositados por Eletrofiação demonstraram captura de 134  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (RAMAKRISHNA, 2006).

Membranas poliméricas depositadas por Eletrofiação, funcionalizadas com semicondutores como  $\text{MoO}_3$ ,  $\text{SnO}_2$  ou  $\text{TiO}_2$ , apresentam alterações em seus valores de

resistência elétrica quando expostos a determinados gases tóxicos. Ou seja, tais materiais podem ser utilizados como sensores eletroquímicos de gás amônia, por exemplo (GOUMA, 2003).

#### 1.2.5. FIOS/MEMBRANAS DE PMMA DEPOSITADAS POR ELETROFIAÇÃO

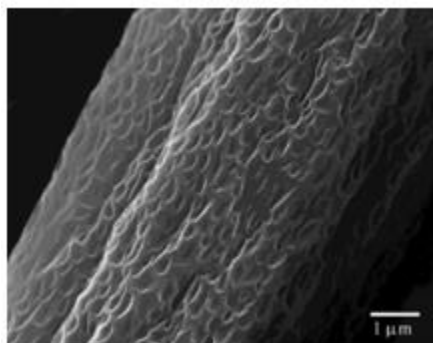
Diversas estruturas nano/micrométricas de PMMA já foram produzidas por Eletrofiação/Eletrospray. Quando o solvente utilizado apresenta um baixo valor de pressão de vapor, como a dimetilformamida (516 Pa), é possível produzir estruturas de PMMA sem nenhuma porosidade (WANG *et al.*, 2009), conforme pode ser observado na figura 14.



**Figura 14 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas de PMMA depositadas por Eletrofiação/Eletrospray. Fios (a), esferas (b), “copos” (c) e “anéis” (d) foram produzidos, através da variação da concentração das soluções contendo dimetilformamida como solvente.**

(Fonte: WANG *et al.*, 2009)

Já quando são utilizados solventes com alta pressão de vapor (usualmente acima de 10 kPa), observa-se a produção de estruturas com alta porosidade.



**Figura 15 – Micrografia eletrônica de varredura de estruturas de PMMA depositadas por Eletrofiação. Fios com alta porosidade foram produzidos, utilizando clorofórmio como solvente.**

(Fonte: MEGELSKI *et al.*, 2002)

As boas propriedades mecânicas do PMMA, associadas à sua insolubilidade em água, tornam os fios produzidos por Eletrofiação extremamente promissores na utilização de filtros,

por exemplo. Entretanto, devido à ausência de grupos funcionais como hidroxilas, carboxilas ou aminas na cadeia polimérica, o PMMA apresenta baixa afinidade/atividade químico-biológica em sua superfície. Tal limitação pode ser contornada através da funcionalização do polímero, que pode ser obtida pela imobilização de uma determinada enzima na superfície do polímero, por exemplo. A possibilidade de imobilização da lipase *Candida rugosa* por adsorção, na superfície de fios de PMMA com aproximadamente 40 nm de diâmetro, já foi demonstrada. Estas estruturas funcionalizadas foram produzidas através da deposição por Eletrofiação de uma solução de PMMA e lipase em dimetilformamida. Graças à alta área superficial destas estruturas foram imobilizadas 332 mg de enzimas por grama de fio polimérico (YOO *et al.*, 2009). A alta eficiência da técnica, e a grande simplicidade experimental do processo permitem que este material possa ser utilizado em substratos para biocatálise (CARVALHO *et al.*, 2014).

Já a funcionalização dos fios de PMMA também pode ocorrer através da deposição de soluções/suspensões de nano-partículas metálicas com PMMA. O fato das nano-partículas de CdSn/ZnS apresentarem capacidade de ligação celular permite que as fibras depositadas sejam utilizadas como suporte para cultura celular. A alta área superficial das fibras, somada à afinidade químico-biológica das nano-partículas metálicas em questão garante grande adesão celular, além de boa taxa de cultura (WEI *et al.*, 2011).

A produção de fios nanométricos de polímeros com baixas massas molares, como o poli(dimetilsiloxano) (PDMS) mostra-se bastante complicada. Para isso frequentemente são empregados outros polímeros com massas molares maiores para dar “suporte” às estruturas depositadas. Isso permite, por exemplo, a produção de substratos (em três dimensões) para micro arranjos de proteínas (*protein microarrays*, em inglês). Estes substratos são vitais no processo de cultura de determinadas células proteicas. A deposição de fios micrométricos de PMMA/PMDS por Eletrofiação mostra-se uma interessante alternativa na produção deste tipo de material (YANG *et al.*, 2009).

### **1.3. ELETROSPRAY COM ATIVAÇÃO SUPERFICIAL INDUZIDA (EISA)**

Conforme discutido anteriormente, é sabido que a funcionalização de polímeros é de suma importância em diferentes áreas de pesquisa, como na química, biologia e ciência de materiais. Este procedimento pode ser realizado através de diferentes técnicas, tais como tratamento superficial por plasma, *grafting* (“enxerto”, do inglês), método químico molhado, dentre outras

(YOO *et al.*, 2009). Entretanto, estas técnicas são muitas vezes complexas e/ou demoradas, além de exigirem aparatos experimentais de alto custo.

A técnica de deposição por Eletrospray com Ativação Superficial Induzida (EISA, acrônimo em inglês), apresenta-se como uma alternativa viável de produção de partículas, filamentos e membranas funcionalizadas com baixíssimo custo e grande simplicidade experimental. Esta técnica foi desenvolvida por nosso grupo de pesquisa no Laboratório de Inovação em Tecnologia de Sensores (LITS) da Universidade Federal do Paraná, em parceria com o Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), empresa relacionada à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

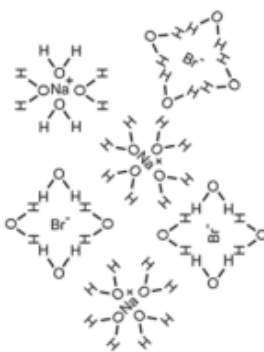
### 1.3.1. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

A técnica de deposição por Eletrospray com Ativação Superficial Induzida é muito semelhante à deposição por Eletrospray/Eletrofição tradicional. Entretanto, o substrato metálico que atua como alvo é substituído por uma solução eletrolítica aterrada composta por água, etanol e brometo de sódio (NaBr). Um diagrama do aparato experimental pode ser observado na figura 16.



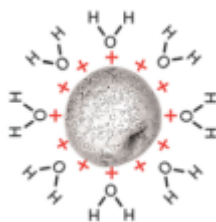
**Figura 16 – Diagrama representativo do processo de deposição EISA. (Fonte: Acervo do autor)**

Este sal, por estar em ambiente aquoso, acaba por sofrer uma dissociação em íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Br}^-$ . Graças ao momento de dipolo elétrico das moléculas de água, e a força eletrostática existente entre estas e os íons provenientes da dissociação, uma completa solvatação destes na solução aquosa é observada, conforme ilustra a figura 17. Vale ressaltar que, *a priori*, outros sais poderiam ser utilizados, como o cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ), por exemplo (FOTI *et al.*, 2015).



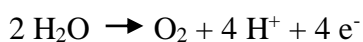
**Figura 17 – Diagrama representativo da solvatação dos íons provenientes da dissociação.**  
(Fonte: FOTI *et al.*, 2015).

Quando as microesferas de poliestireno (altamente ionizadas) encontram a superfície da solução eletrolítica, uma forte atração eletrostática entre os átomos de oxigênio e as cargas na superfície do polímero é observada. Isso é justificado pelo desbalanceamento eletrônico proveniente do intenso momento dipolar das moléculas de água, conforme demonstrado na figura 18:



**Figura 18 – Diagrama representativo da solvatação das microesferas ionizadas de poliestireno.**  
(Fonte: FOTI *et al.*, 2015).

Assim, quando as microesferas encontram a solução eletrolítica acabam por forçar a movimentação de portadores de cargas elétricas negativas em direção à superfície do polímero, em um processo semelhante à um descarregamento elétrico. A energia proveniente deste fenômeno é suficiente para causar uma oxidação das moléculas de água, conforme explicitado na equação 1:



**Equação 1 – Reação química da oxidação da água, proveniente do descarregamento elétrico das microesferas ionizadas.** (Fonte: FOTI *et al.*, 2015).





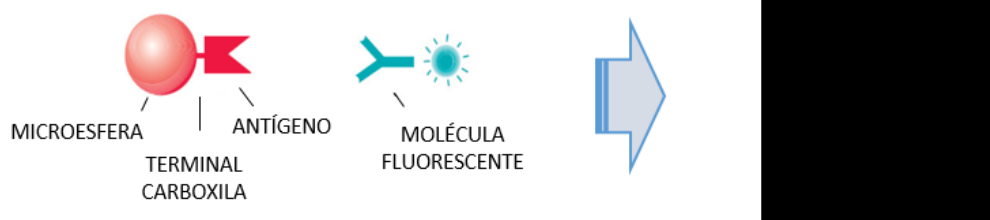
**Figura 19 – Diagrama representativo do procedimento completo de ativação: solvatação das microesferas ionizadas, descarregamento das mesmas e incorporação de radicais hidroxilas na superfície das microestruturas. Graças à presença de ligações duplas entre átomos de carbono e oxigênio, tem-se então uma superfície “carboxilada”. (Fonte: FOTI *et al.*, 2015).**

No presente exemplo os anéis aromáticos do poliestireno acabam partidos, e, graças à incorporação do oxigênio liberado pela oxidação da água, percebe-se a incorporação de hidroxilas à cadeia polimérica. Se observa então, graças à cadeia do polímero utilizado, a “carboxilação” da superfície das microesferas. Em outras palavras, este processo acaba por funcionalizar a superfície das microestruturas.

### 1.3.2. APLICAÇÃO DA TÉCNICA

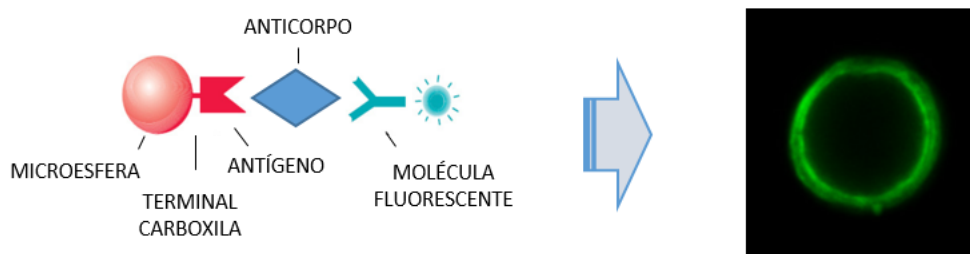
Os radicais carboxila (que contém hidroxilas) imobilizados na superfície das microesferas mostram a possibilidade de captura de moléculas específicas, graças justamente à afinidade destes grupos funcionais. Com isso em mente, graças à parceria do nosso grupo de pesquisa com o Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), foram realizados testes de detecções biológicas do tipo *ELISA* (acrônimo em inglês para Ensaio Imunossorvente de Enzimas Ligadas) (FOTI *et al.*, 2015) utilizando o material produzido.

Devido a disponibilidade do IBMP, foi verificada a possibilidade de utilização das microesferas funcionalizadas para a detecção de anticorpos de sífilis. O processo de detecção ocorre através do acoplamento dos terminais carboxila (imobilizados na superfície das microesferas) com antígenos TP47 e TP17 de sífilis, e com moléculas marcadoras, como as proteínas com fluorescência verde (*GFP*, acrônimo em inglês). Assim, quando o exame é realizado com uma amostra de sangue não contaminado, isto é, com ausência de anticorpos de sífilis, nenhuma molécula marcadora é acoplada às microesferas funcionalizadas. Com isso, após o processo de lavagem, nenhuma fluorescência é observada, demonstrando então um diagnóstico negativo para anticorpos da doença, conforme demonstrado na figura 20:



**Figura 20 – Diagrama simplificado do processo de detecção de antígenos de sífilis, em amostra não contaminada. Sem a presença do anticorpo característico, não ocorre o acoplamento da esfera com a molécula fluorescente. Logo, após a lavagem, nenhum processo de fluorescência é observado (Fonte: FOTI *et al.*, 2015).**

Todavia, quando o sangue contaminado é utilizado, a presença de tais anticorpos promove o acoplamento molecular da esfera com as proteínas marcadoras, culminando em um intenso processo de fluorescência (figura 21).



**Figura 21 – Diagrama simplificado do processo de detecção biológica, em amostra contaminada. Com a presença do anticorpo característico ocorre o acoplamento da esfera com a molécula marcadora. É possível observar então o processo de fluorescência. (Fonte: FOTI *et al.*, 2015).**

A fluorescência observada indica, então, um diagnóstico positivo para anticorpos de sífilis. A reprodutibilidade, confiabilidade e baixo custo envolvido no processo permitem então a utilização de estruturas micrométricas depositadas por *EISA* em ensaios de detecção biológica do tipo *ELISA*. E como este processo de detecção é basicamente o mesmo para todas as doenças, tais microestruturas apresentam potencial para prover o diagnóstico de quaisquer enfermidades que possam ser detectadas pelo método *ELISA*, desde que se utilizem os antígenos e anticorpos pertinentes a cada situação (FOTI *et al.*, 2015).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. GERAIS**

- Produzir e caracterizar nano/microestruturas porosas de PMMA depositadas através da técnica de Eletrofiação.
- Investigar a possibilidade de ativação/funcionalização química das estruturas poliméricas durante o processo de deposição *EISA*, generalizando o processo para Eletrofiação com Ativação Superficial Induzida.
- Avaliar a possibilidade de aplicação do material funcionalizado na detecção de doenças, através do método *ELISA*.

### **2.2. ESPECÍFICOS**

- Investigar os parâmetros experimentais necessários para a deposição de diferentes estruturas porosas de PMMA *cast* e de PMMA Sigma
- Caracterizar física e quimicamente o polímero e as soluções utilizadas nas deposições.
- Caracterizar morfologicamente as estruturas depositadas, definindo quais as melhores condições experimentais para produção de estruturas com alta porosidade (e consequentemente com grande área superficial).
- Caracterizar a ativação química das deposições realizadas por Eletrofiação funcionalizante (*EISA*), identificando quais grupos funcionais são incorporados às cadeias poliméricas originais.
- Avaliar a possibilidade de aplicação do material funcionalizado na detecção de anticorpos de HIV, através do método *ELISA*, no IBMP.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão expostos todos os materiais e equipamentos utilizados neste trabalho, em todas as suas fases. Além disso, uma rápida exposição dos métodos de preparação das soluções, de deposição das estruturas, e das técnicas de caracterização utilizadas pode ser aqui observado. A fim de evitar o excesso de informações não essenciais no texto, a exposição/discussão mais detalhada acerca dos solventes utilizados está localizada no Anexo I.

#### 3.1. POLÍMEROS E SOLVENTES

- Poli (metil metacrilato), chapa acrílica Acrigel® – PMMA *cast*.



**Figura 22 – Cubos de PMMA obtidos através do corte de chapas acrílicas. (Fonte: Acervo do autor)**

- Poli (metil metacrilato) em pó, Sigma Aldrich - PMMA Sigma.
- Clorofórmio P.A. (CLF), estabilizado com amileno.
- Diclorometano P.A. (DM)
- Metiletilcetona P.A. (MEC)
- Ciclohexanona P.A. (CH)

Todos os solventes supracitados foram adquiridos da empresa Vetec Química®.

#### 3.2. ADITIVOS PARA SOLUÇÃO ELETROLÍTICA DE ATIVAÇÃO

- Brometo de Sódio 99% (NaBr)
- Álcool Etílico P.A. (Etanol)

Todos os aditivos supracitados foram adquiridos da empresa Vetec Química®.

### 3.3. REAGENTES PARA ENSAIOS BIOLÓGICOS

- Antígeno para detecção de HIV - GECHIVS302 - Fapon Biotech®.
- Proteína marcadora fluorescente - Ficoeritrina - #GTIG-001 - Moss Substrates®.
- Proteína marcadora fluorescente - *GFP* - Moss Substrates®.
- N-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS) - Vetec Química®.
- 1-Etil-3-(3dimetilaminopropil) carbodiimida (*EDC*) - Vetec Química®.
- Solução tampão fosfato-salina com pH 7,2 (PBS 7,2) - Vetec Química®.

### 3.4. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS

#### 3.4.1. PMMA CAST COMO SOLUTO

As chapas acrílicas foram cortadas em cubos com 3 milímetros de lado, com a ajuda de uma fresadora a laser, marca Gravograph, modelo LS100. Os cubos foram então solubilizados nos quatro solventes (Clorofórmio, Diclorometano, Metiletilcetona e Ciclohexanona). Para determinar a percentual em massa (concentração mássica) do polímero em cada solução utilizou-se a equação 2:

$$C (\% \text{ em massa}) = \frac{m_p}{m_p + m_s} \times 100$$

**Equação 2 – Determinação da concentração mássica do polímero, na qual ‘C (% em massa)’ é a fração mássica percentual do PMMA (em relação à massa total da solução), ‘mp’ é a massa do PMMA e ‘ms’ é a massa do solvente.**

Para garantir a total solubilização do polímero foi utilizado um agitador magnético por 48 horas, operado sempre à temperatura ambiente. Foram produzidas então soluções translúcidas e homogêneas.



**Figura 23 – Solução de PMMA *cast* em clorofórmio. Mesma aparência foi observada em todas as soluções produzidas.**

Um resumo de todas as soluções produzidas (utilizando PMMA *cast* como soluto) pode ser observado na tabela 3:

**Tabela 3 – Descrição de todas as soluções produzidas utilizando PMMA *cast* como soluto.**

Soluto	Solvente	Concentração	Nome da solução
PMMA <i>cast</i>	Clorofórmio (CLF)	0,5%	PMMAc_0,5%_CLF
		1,0%	PMMAc_1,0%_CLF
		1,5%	PMMAc_1,5%_CLF
		2,0%	PMMAc_2,0%_CLF
		2,5%	PMMAc_2,5%_CLF
		3,0%	PMMAc_3,0%_CLF
	Diclorometano (DM)	0,5%	PMMAc_0,5%_DM
		1,0%	PMMAc_1,0%_DM
		1,5%	PMMAc_1,5%_DM
		2,0%	PMMAc_2,0%_DM
		2,5%	PMMAc_2,5%_DM
		3,0%	PMMAc_3,0%_DM
	Metiletilcetona (MEC)	0,5%	PMMAc_0,5%_MEC
		1,0%	PMMAc_1,0%_MEC
		1,5%	PMMAc_1,5%_MEC
		2,0%	PMMAc_2,0%_MEC
		2,5%	PMMAc_2,5%_MEC
		3,0%	PMMAc_3,0%_MEC
	Ciclohexanona (CH)	0,5%	PMMAc_0,5%_CH
		1,0%	PMMAc_1,0%_CH
		1,5%	PMMAc_1,5%_CH
		2,0%	PMMAc_2,0%_CH
		2,5%	PMMAc_2,5%_CH
		3,0%	PMMAc_3,0%_CH

### 3.4.2. PMMA SIGMA COMO SOLUTO

A fim de comparação, foram produzidas também soluções de PMMA Sigma em Clorofórmio e Diclorometano. O mesmo processo de agitação foi utilizado, também por 48 horas. As concentrações aqui utilizadas, entretanto, são propositalmente diferentes do caso anterior. A discussão sobre esta decisão será realizada em “Resultados e discussão”.

**Tabela 4 – Descrição de todas as soluções produzidas utilizando PMMA Sigma como soluto.**

Soluto	Solvente	Concentração	Nome da solução
PMMA Sigma	Clorofórmio (CLF)	2,0%	PMMA <sub>s</sub> _2,0%_CLF
		4,0%	PMMA <sub>s</sub> _4,0%_CLF
		6,0%	PMMA <sub>s</sub> _6,0%_CLF
		8,0%	PMMA <sub>s</sub> _8,0%_CLF
		10,0%	PMMA <sub>s</sub> _10,0%_CLF
	Diclorometano (DM)	2,0%	PMMA <sub>s</sub> _2,0%_DM
		4,0%	PMMA <sub>s</sub> _4,0%_DM
		6,0%	PMMA <sub>s</sub> _6,0%_DM
		8,0%	PMMA <sub>s</sub> _8,0%_DM
		10,0%	PMMA <sub>s</sub> _10,0%_DM

As soluções produzidas também se apresentaram translúcidas e homogêneas, também com diferentes viscosidades. Visualmente as soluções mostraram-se idênticas ao caso anterior.

### 3.5. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO ELETROLÍTICA DE ATIVAÇÃO

Para a produção da solução eletrolítica utilizada na técnica de deposição *EISA*, foi utilizada uma cuba plástica contendo água bidestilada, etanol e brometo de sódio (NaBr) nas seguintes quantidades:

- Água bidestilada: 250 ml
- Etanol: 250 ml
- NaBr: 11,32g

Assim, uma solução translúcida e eletricamente condutora com concentração de 0,22 mol/L foi produzida, conforme demonstrado na figura 24.



**Figura 24 - Cuba plástica utilizada na técnica de deposição *EISA*, contendo a solução eletrolítica de ativação**

### **3.6. DEPOSIÇÕES**

#### **3.6.1. ELETROFIAÇÃO TRADICIONAL**

Em um primeiro momento apenas a deposição por Eletrofiação foi realizada, a fim de se avaliar a relação entre a concentração das soluções (com seus respectivos solventes) e a morfologia das estruturas depositadas.

##### **3.6.1.1. APARATO EXPERIMENTAL**

Para realizar estas deposições fez-se uso dos seguintes equipamentos:

- Fonte de alta tensão METEK DC (40 kV/100 mA)



**Figura 25 – Fonte de alta tensão utilizada.**



- Bomba de seringa Harvard modelo 11plus



**Figura 26 – Bomba de seringa utilizada.**

- Seringa Hamilton Gastight™ #1750, com agulha hipodérmica (0,55 mm x 20 mm) BD *Precision Glide* retificada para eliminação do bisel da ponta.



**Figura 27 – Seringa de vidro utilizada, já com agulha.**

- Aparato alvo de alumínio, com *stub* recoberto por fita dupla face de cobre 3M® agindo como substrato.



**Figura 28 – Aparato experimental utilizado na técnica de deposição por Eletrofição tradicional.**

#### 3.6.1.2. PARÂMETROS DE DEPOSIÇÃO

- Tensão elétrica: entre  $(5,10 \pm 0,05)$  kV e  $(9,50 \pm 0,05)$  kV
- Distância entre capilar metálico e substrato:  $(20,00 \pm 0,05)$  cm
- Vazão da seringa: entre  $(3,40 \pm 0,05)$   $\mu\text{L}/\text{min}$  e  $(9,20 \pm 0,05)$   $\mu\text{L}/\text{min}$
- Temperatura: entre  $(20,00 \pm 0,05)$  °C e  $(22,00 \pm 0,05)$  °C
- Umidade relativa: entre  $(55,0 \pm 0,5)$  % e  $(69,0 \pm 0,5)$  %
- Tempo de duração: 10 minutos

Os valores dos parâmetros utilizados em cada deposição serão discriminados em ‘Resultados e discussão’.

#### 3.6.2. ELETROFIAÇÃO COM ATIVAÇÃO SUPERFICIAL INDUZIDA (EISA)

Após a caracterização de cada amostra depositada, escolheu-se a que apresentava as características mais apropriadas aos objetivos deste trabalho (isto é, fios homogêneos com a maior porosidade, além grande reprodutibilidade), para a tentativa de funcionalização durante a deposição (EISA). A discussão mais aprofundada acerca de tal escolha foi realizada no capítulo ‘Resultados e discussão’.

### 3.6.2.1. APARATO EXPERIMENTAL

Para realizar estas deposições fez-se uso dos mesmos equipamentos do caso anterior, com exceção do aparato metálico, aqui substituído pela cuba plástica contendo a solução eletrolítica anteriormente descrita. Uma malha de aço inoxidável submersa foi utilizada para que, quando conectada ao terminal neutro, pudesse prover o aterramento. Na figura 29 é possível observar a nova montagem experimental:



**Figura 29 – Aparato experimental utilizado na técnica de deposição EISA.**

### 3.6.2.2. PARÂMETROS DE DEPOSIÇÃO

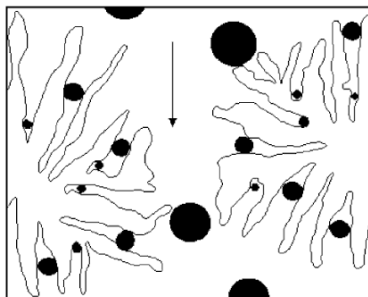
- Tensão elétrica:  $(7,50 \pm 0,05)$  kV
- Distância entre capilar metálico e substrato:  $(20,0 \pm 0,05)$  cm
- Vazão da seringa:  $(8,40 \pm 0,05)$   $\mu\text{L}/\text{min}$
- Temperatura:  $(20,00 \pm 0,05)$  °C
- Umidade relativa:  $(61,0 \pm 0,5)$  %
- Tempo de duração: 2 horas

Como as amostras acabam por submergir na solução eletrolítica, optou-se por realizar um processo padronizado de lavagem e secagem das mesmas. Para isso, as amostras recolhidas da cuba plástica foram submergidas em 500 ml de água bidestilada por 24 horas. Em seguida repetiu-se este processo mais duas vezes, sempre trocando a água e o recipiente, para garantir a correta lavagem. Logo após, o material depositado (e agora limpo) foi seco em estufa, à 80 °C, por 24 horas.

### 3.7. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

#### 3.7.1. CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL (GPC)

Esta técnica é empregada na averiguação dos valores e distribuições de massas molares de polímeros. Para a investigação destes parâmetros solubiliza-se o polímero desejado em um solvente orgânico, frequentemente o Tetrahidrofurano (THF). Com o auxílio de uma bomba, esta solução é então injetada em um conjunto de colunas, as quais apresentam em seu interior partículas com diferentes porosidades, que acabam por separar as moléculas do polímero investigado por exclusão de tamanho.



**Figura 30 – Diagrama ilustrativo do processo de separação de partículas por exclusão de tamanho, em coluna de GPC (Fonte: Divulgação).**

Um ou mais detectores podem ser usados para medir a dispersão/difração de radiação proveniente de um laser de UV ou IV incidente. A medida, afinal, fornece o tamanho de cada conjunto de moléculas, na forma de uma dispersão de valores de massas molares, frequentemente exibidas no formato de uma curva gaussiana.

Diferentes análises estatísticas podem ser utilizadas para se obter informações sobre as massas molares das cadeias investigadas. A massa molar numérica média ( $M_n$ ) leva em consideração a simples média entre as massas molares de cada cadeia com diferentes tamanhos. A massa molar mássica média ( $M_w$ ), também conhecida como massa molar ponderal média, leva mais em conta as maiores cadeias que se repetem em maior quantidade. Esta medida é a mais utilizada na literatura, quando se realiza a comparação entre diferentes polímeros (CALLISTER, 2013).

$$M_n = \frac{\sum M_i N_i}{\sum N_i}, \quad M_w = \frac{\sum M_i^2 N_i}{\sum M_i N_i}$$

**Figura 31 – Diferentes massas molares e suas abordagens estatísticas.**

O índice de polidispersidade, por sua vez, é a razão entre a massas molares mássica e numérica. Quanto maior este índice, maior a dispersão de tamanho entre as cadeias do polímero investigado. Quanto menor, entretanto, mais homogêneas (em tamanho) são as cadeias poliméricas do material (CALLISTER, 2013).

As medidas de massa molar dos polímeros foram realizadas no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (IQ – UFRGS) com equipamento *GPC* Viscotek, modelo EDA 302, com THF como solvente, em colunas de PS/DVB. Para tal, 10 mg de polímero foram solubilizados em 4 ml de THF. Esta solução foi então injetada nas referidas colunas à taxa de 1 ml/min.



**Figura 32 – Equipamento utilizado para realizar as medidas de massa molar dos polímeros.**

(Fonte: IQ – UFRGS)

### 3.7.2. REOLOGIA

A técnica de reologia é utilizada para caracterizar soluções poliméricas, principalmente grandezas relativas às suas viscosidades. Quando se utilizam soluções poliméricas suficientemente diluídas, é possível aferir ainda grandezas químicas que informam a compatibilidade entre solutos e solventes utilizados. Neste caso esta técnica foi empregada para

aferir a viscosidade das soluções, bem como a relação da mesma com a taxa de cisalhamento aplicada.

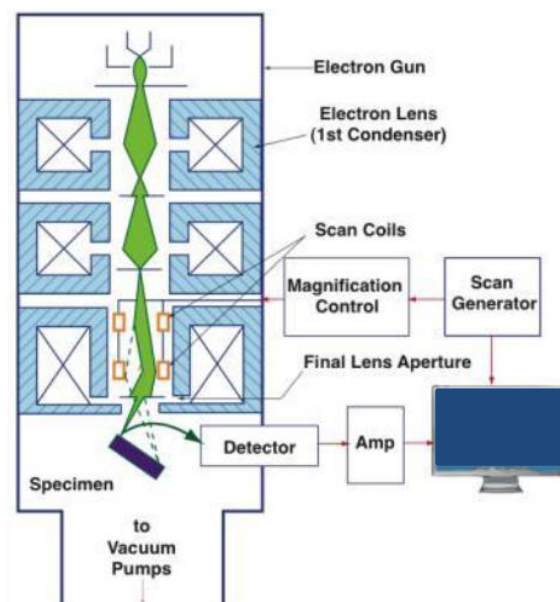
O equipamento capaz de realizar estas medidas é o reômetro, composto por uma cuba de aço inox com um cilindro de prova acoplado a um sistema automatizado. Esta cuba é então preenchida com a solução polimérica a ser investigada, e, através de um sistema informatizado, o cilindro de prova é posto a girar à uma taxa conhecida. Esta rotação acaba por induzir um movimento de cisalhamento na solução polimérica. Ao realizar a variação da taxa de cisalhamento, e medição simultânea do valor da viscosidade da solução, pode se determinar se o comportamento viscosimétrico é linear, isto é, se a mesma se caracteriza como uma solução newtoniana. Para tal, utilizou-se um reômetro marca Thermo Scientific, modelo HAAKE RheoStress1, no Laboratório de Biopolímeros da UFPR, exposto na figura 33.



**Figura 33 – Reômetro utilizado para medidas de viscosidade. (Fonte: Biopol – UFPR)**

### 3.7.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

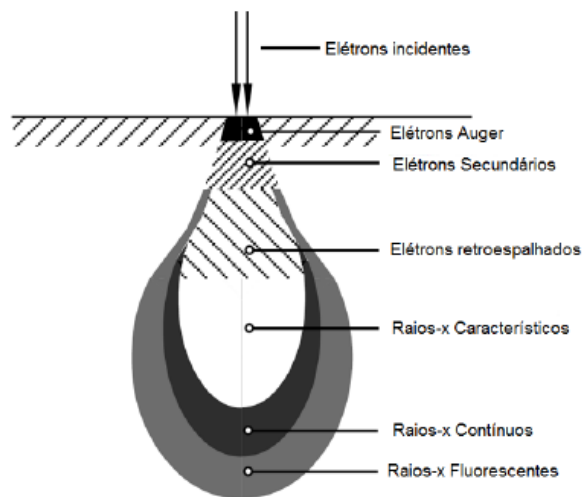
A caracterização morfológica de materiais nano/micro estruturados frequentemente é realizada através de MEV. O equipamento que utiliza esta técnica é composto por um filamento de tungstênio (ou um canhão de elétrons), diversas lentes eletromagnéticas (responsáveis pela colimação e direcionamento do feixe), sistema de varredura, e detectores, além de outros componentes de controle e amplificação, conforme pode ser visto no diagrama ilustrativo da figura 34:



**Figura 34 – Diagrama ilustrativo do processo de coleta de medidas de microscopia eletrônica de varredura. (Fonte: IF – UFRGS)**

O filamento (ou canhão) é responsável pela produção do feixe de elétrons que incidirá na amostra analisada. A fim de se evitar eventuais colisões indesejadas destes elétrons com materiais particulados (poeira, por exemplo), todo o procedimento é efetuado em vácuo. A interação deste feixe com os átomos da amostra acaba por produzir elétrons e fótons que, após serem coletados/aferidos por detectores e convertidos em sinais de vídeo, fornecem informações sobre a morfologia e composição química do material investigado.

O nível de penetração dos elétrons incidentes na amostra analisada depende diretamente de suas energias cinéticas, ou seja, da tensão elétrica a que foram submetidos no processo de aceleração. Como pode-se imaginar, maiores energias cinéticas implicam em maiores profundidades alcançadas. E, com isso, maior a energia dos elétrons ejetados pelo material, como pode ser observado na figura 35.



**Figura 35 – Diagrama demonstrativo da relação entre a profundidade alcançada pelos elétrons incidentes e os elétrons ejetados pelo material. Maiores profundidades resultam na produção de elétrons com maiores energias cinéticas. (Fonte: IF – UFRGS)**

Quando se busca a caracterização morfológica da superfície de materiais, geralmente é utilizada a detecção de elétrons retroespalhados ou secundários. Para isso, frequentemente opta-se por tensões de aceleração entre 10 kV e 20 kV. Dependendo do equipamento utilizado outros tipos de medidas podem ser realizados, como catodo-luminescência (CL) e espectroscopia de dispersão de raios-x (EDS). Estas podem fornecer informações das propriedades elétricas/ópticas e da composição química (identificação de elementos químicos) das amostras investigadas, respectivamente.

Neste trabalho a técnica de MEV foi escolhida especificamente para a realização da caracterização morfológica da superfície das estruturas depositadas. Para tal foi utilizado o equipamento TESCAN modelo VEJA3 LMU, no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (CME – UFPR), aqui exposto na figura 36.

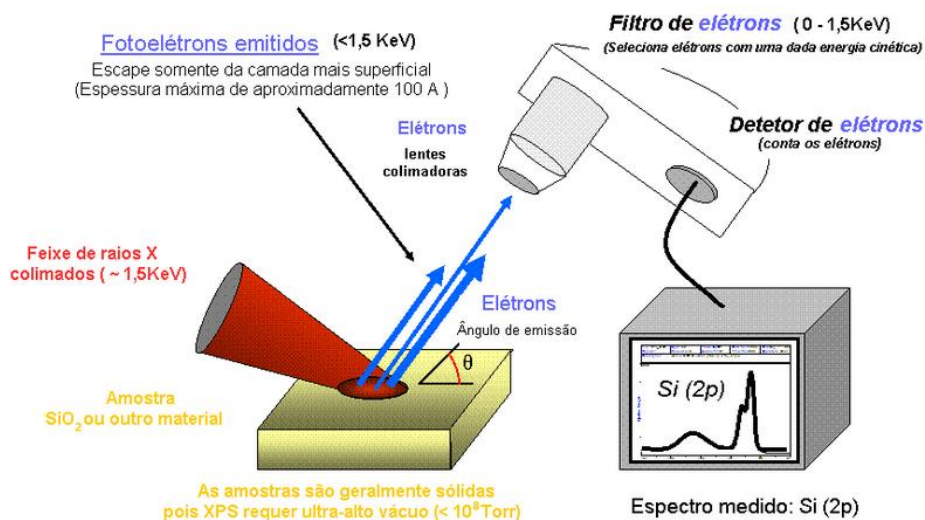




**Figura 36 – Microscópio eletrônico de varredura utilizado. (Fonte: CME – UFPR)**

#### 3.7.4. ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS EXCITADOS POR RAIOS-X (XPS)

Esta técnica é extremamente útil na caracterização química da superfície de materiais. Através da incidência de feixes de raios-x sobre o material a ser analisado, os elétrons deste são excitados para níveis superiores de energia. Ao retornarem para seus estados originais, por conservação de energia, acabam por emitir elétrons (fotoelétrons) com energias cinéticas da ordem de 1,5 keV, que são então “filtrados” (de acordo com suas diferentes energias) e detectados. A análise da energia cinética destes fornece informações de quais elementos químicos estão presentes na amostra, em quais concentrações, estados de oxidação, e os tipos (e intensidades) de ligações entre eles. Graças à alta precisão envolvida no processo, todo o procedimento é realizado em ambiente de ultra alto vácuo, a fim de prevenir colisões entre os elétrons e quaisquer materiais particulados.



**Figura 37 – Diagrama ilustrativo do funcionamento da técnica de espectroscopia de fotoelétrons de raios-x. (Fonte: IF - UFRGS)**

Esta técnica foi escolhida para avaliar a funcionalização superficial das amostras depositadas por *EISA*. Para isso, medidas comparativas entre as amostras produzidas por Eletrofiação (sem funcionalização) e por *EISA* (funcionalizadas) foram realizadas, a fim de se avaliar as diferenças entre as ligações químicas presentes na superfície destas amostras. Para isso foi utilizado o equipamento Omicron-EA125, no Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (IF-UFRGS), com os seguintes parâmetros:

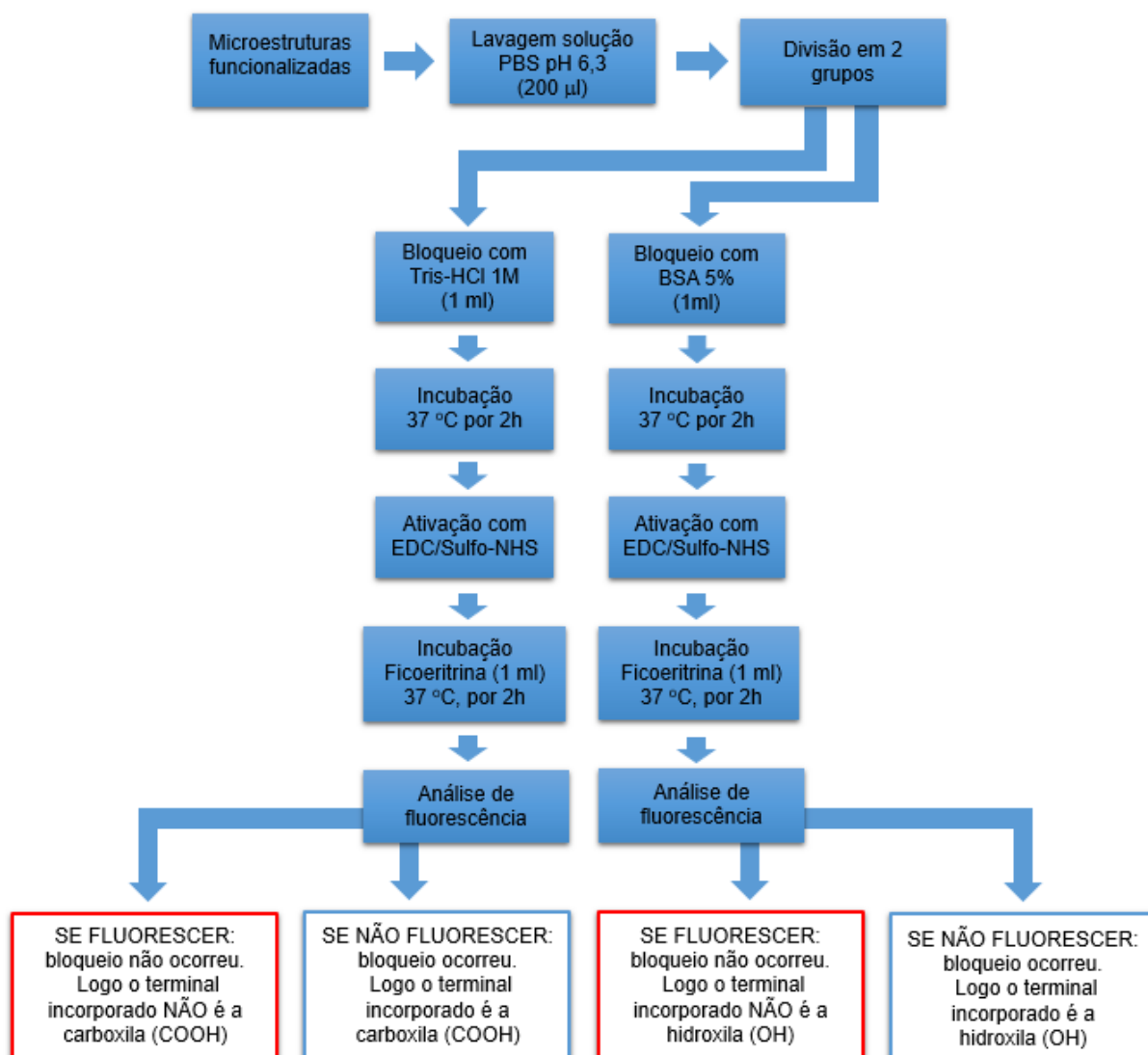
- Radiação incidente (Al K $\alpha$ ): 1486,6 eV
- Espectro de ligações carbono s1 (Cs1)
- Resoluções: 50 eV (*survey*) e 10 eV (alta resolução)
- Ângulo de medida (entre a superfície da amostra e a direção de detecção): 53°

### 3.7.5. ENSAIOS DE IDENTIFICAÇÃO/CONFIRMAÇÃO DO GRUPO FUNCIONAL

A fim de confirmar qual o grupo funcional foi de fato incorporado à cadeia polimérica original, foram realizados ensaios biológicos de bloqueio destes terminais. Estes ensaios foram necessários a fim de corroborar e complementar as medidas realizadas por *XPS*, e foram realizados pela M.<sup>a</sup> Amanda Leitolis, sob supervisão do Dr. Leonardo Foti, no Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP). Embora o procedimento descrito a seguir possa parecer

complexo, a ideia deste teste é tentar realizar o bloqueio da atividade do terminal acoplado à cadeia polimérica original durante o processo de funcionalização. Entretanto, a dúvida é justamente qual é exatamente este terminal. Assim, fez-se uso de diferentes “bloqueadores” que só agem em terminais específicos. Assim, se o bloqueio ocorrer, sabe-se com exatidão qual terminal está sendo de fato bloqueado, ou seja, qual o grupo funcional foi de fato acoplado durante a funcionalização.

O ensaio tem início com a lavagem das estruturas poliméricas depositadas (acomodadas em tubos de ensaio), com a utilização de uma solução tampão fosfato-salina (PBS), de 200 µl, com pH 6,3. Em seguida, todo o material previamente depositado é separado em dois grupos. As amostras constituintes do primeiro grupo foram inseridas em novos tubos de ensaio contendo 1 ml de Tris (hidroximetil) amino metano - HCl (Tris-HCl), com concentração de 1M e pH 7,4. Já o material pertencente ao segundo grupo foi inserido em outros tubos de ensaio contendo Albumina Bovina Sérica (*BSA*) 5%, também 1 ml. Logo em seguida as amostras de ambos os grupos foram incubadas a 37°C, durante 2 horas. Logo após adicionaram-se os compostos N-hidroxisulfosucinimida (Sulfo-NHS) e 1-Etil-3-(3dimetilaminopropil) carbodiimida (*EDC*) (ambos em concentração 50 mg/ml, a 25°C, por 20 min) a todos os tubos de ensaio, contendo todas as amostras. Este procedimento foi realizado a fim de converter os terminais acoplados à cadeia polimérica, sejam eles carboxilas e/ou hidroxilas, em grupos amina, únicos que permitem o acoplamento das proteínas marcadoras fluorescentes. Após novo processo de lavagem com solução tampão, as amostras foram incubadas com 1 ml de Ficoeritrina (5 µg/ml), a 37°C por 2 horas. Nova lavagem foi então realizada, para enfim a análise de fluorescência no microscópio de deconvolução ser realizada. Um resumo de todos estes processos pode ser observado na figura 38:



**Figura 38 – Diagrama representativo dos processos realizados durante o ensaio de identificação dos grupos funcionais.**

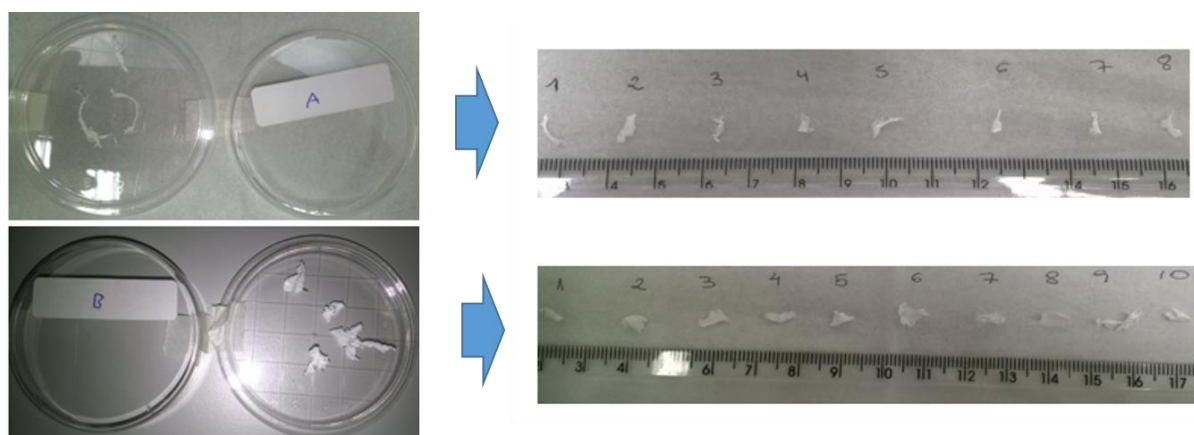
O Tris-HCl é uma amina primária, e por isso apresenta a propriedade de se ligar a carboxilas. Assim, se as microestruturas funcionalizadas de fato apresentarem grupos carboxila acoplados à cadeia polimérica original, o Tris-HCl acabaria por “anular/bloquear” a atividade destes terminais. Com isso estas carboxilas perderiam a capacidade de se ligar às proteínas marcadoras fluorescentes. Ou seja, se a funcionalização estiver acontecendo com a incorporação de carboxilas, ao fim deste ensaio nenhum processo de fluorescência seria observado. Por outro lado, o BSA tem a capacidade de realizar ligações com diversos grupos funcionais (dentre eles as hidroxilas), mas é incapaz de se ligar a terminais carboxila. Em outras palavras, observando-se também os resultados obtidos por XPS, se a funcionalização estivesse ocorrendo através da incorporação de terminais hidroxila o BSA se ligaria a estes, impedindo a

conexão com as proteínas marcadoras fluorescentes, e consequentemente resultando na ausência do processo de fluorescência.

### 3.7.6. ENSAIOS DE DETECÇÃO DE ANTICORPOS DE HIV

A produção das microestruturas funcionalizadas de PMMA abriu a possibilidade de tentativa de aplicação destes materiais em ensaios biológicos de diagnósticos de doenças. Graças a disponibilidade de material, e aos grupos funcionais acoplados à cadeia polimérica original, realizaram-se ensaios de detecção de anticorpos de HIV. Estes foram realizados também pela M.<sup>a</sup> Amanda Leitolis, sob supervisão do Dr. Leonardo Foti, no Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP). Para tal utilizou-se uma metodologia muito semelhante ao caso anterior, conhecida como método *ELISA* (acrônimo em inglês para Ensaio de Imunossorção ligado a Enzimas). Este tipo de ensaio é muito utilizado em diagnósticos de doenças, graças à simplicidade de operação e confiabilidade do processo (FOTI *et al.*, 2015).

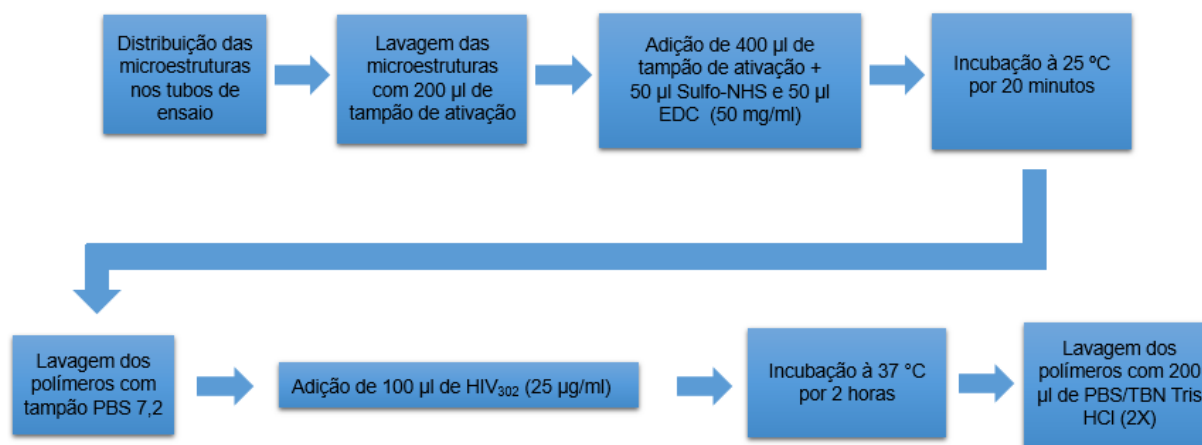
A fim de comparação, utilizou-se uma amostra funcionalizada (A) e outra não funcionalizada (B). Ambas foram divididas em pedaços de tamanhos semelhantes, conforme visto na figura 39.



**Figura 39 – Amostras funcionalizadas (A) e não funcionalizadas (B), subdivididas em pedaços de dimensões semelhantes.**

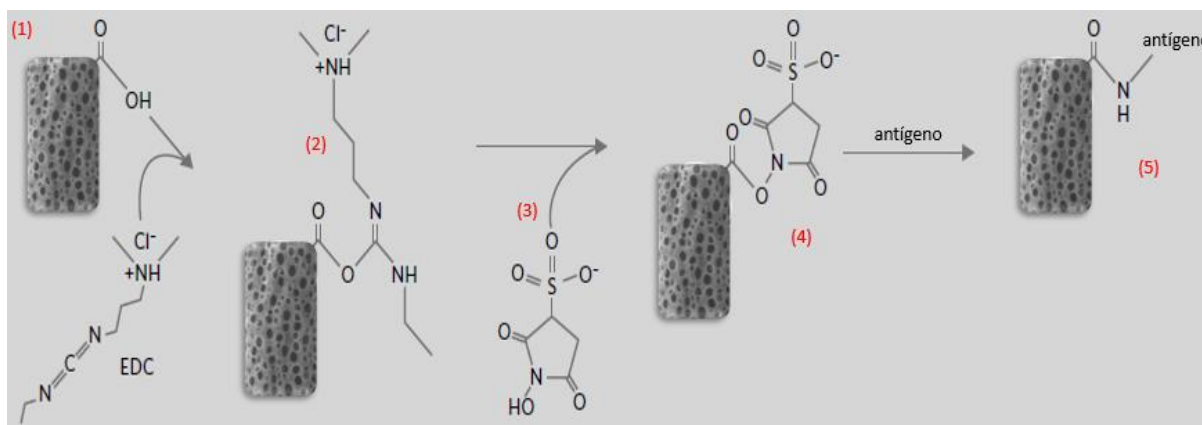
As amostras foram então lavadas com uma solução tampão de ativação, e, logo em seguida, adicionou-se Sulfo-NHS e *EDC*. Assim como nos testes de bloqueio, ambos os compostos têm como finalidade ‘ativar’ a superfície funcionalizada das microfibras, a fim de propiciar o acoplamento das mesmas aos compostos que serão adicionados em seguida. Após o período de incubação nova lavagem foi realizada, desta vez com uma solução tampão fosfato-salina com

pH 7,2 (PBS 7,2). Logo após acrescentaram-se os antígenos HIV<sub>302</sub>, seguido de novo processo de incubação e lavagem. Um resumo destas etapas pode ser observado na figura 40:



**Figura 40 - Diagrama representativo dos processos de acoplamento dos antígenos às cadeias poliméricas**

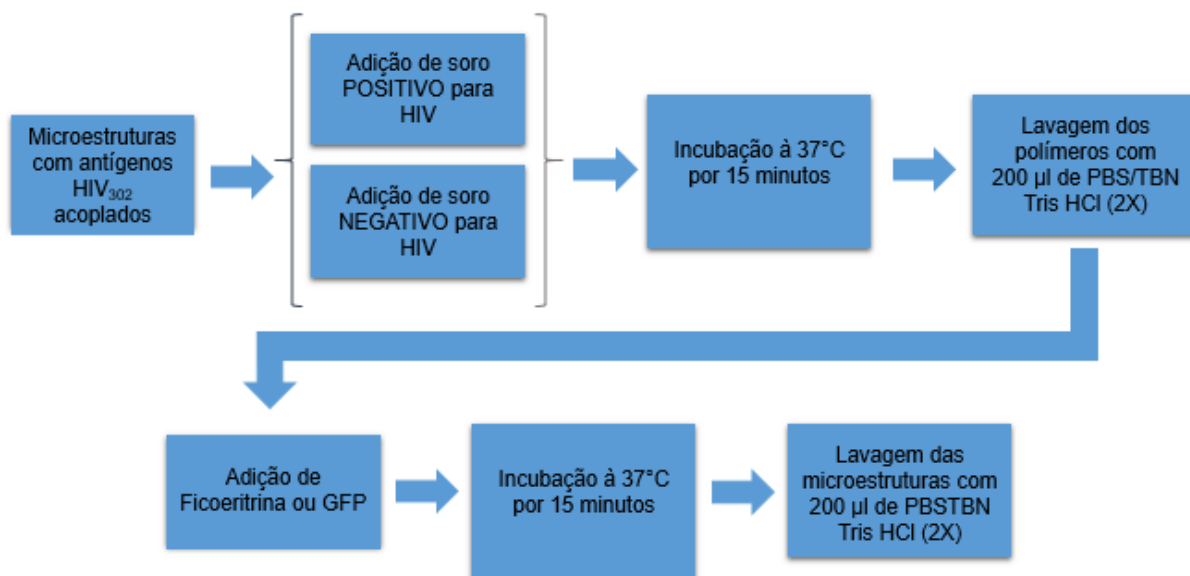
O detalhamento da rota química utilizada pode ser observada na figura 41:



**Figura 41 - Diagrama do processo de acoplamento de antígenos às microestruturas funcionalizadas. Após o processo de deposição/funcionalização as microestruturas apresentam um terminal funcional acoplado (1). Após a reação com o EDC (2) e Sulfo-NHS (3), realizou-se o acoplamento dos antígenos utilizados (4) e (5). (Fonte: Acervo do autor)**

Em suma, todos os processos supracitados foram realizados para preparar o material para os ensaios de detecção de anticorpos de HIV. Neste processo foram adicionadas, separadamente, amostras de soro positivo e negativo para HIV aos dois conjuntos de materiais (funcionalizados e não funcionalizados). Neste ponto, novo processo de incubação foi realizado, seguido de lavagem com soluções PBS/TBN Tris HCl. Em seguida acrescentaram-se

anticorpos ligados a moléculas de Ficoeritrina, que atuam neste caso como “analitos” no processo de detecção. Após nova lavagem, as amostras passaram pelo processo de análise de fluorescência, com o auxílio de um microscópio de deconvolução. Um resumo destes processos pode ser observado na figura 42.



**Figura 42 – Diagrama ilustrativo de todas as etapas do ensaio de detecção.**

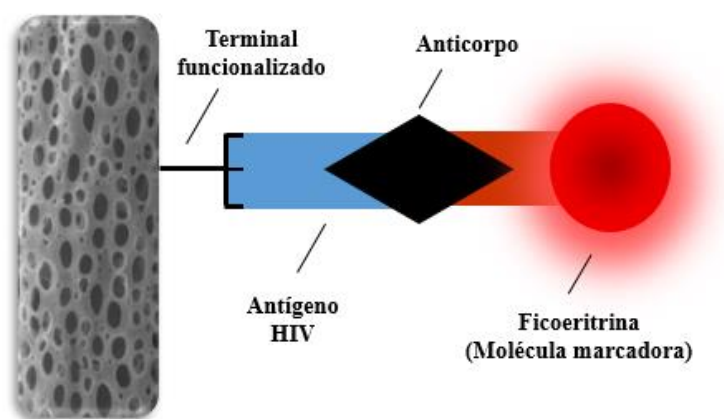


**Figura 43 – Microscópio de deconvolução utilizado na análise de fluorescência das amostras. Análise pode ser feita por cada cor, separadamente, ou pela sobreposição destas, por contraste de fase.**

(Fonte – IBMP)

Quando todos os acoplamentos químicos ocorrem com sucesso, as moléculas marcadoras fluorescentes permanecem ligadas ao anticorpo (que por sua vez está ligado aos terminais

funcionalizados na cadeia polimérica), podendo então ser detectadas. Assim, quando um ensaio biológico se mostra positivo (presença de sangue contaminado), observa-se a coloração vermelha (Ficoeritrina) ou verde (*GFPs*). Quando o diagnóstico se mostra negativo, por sua vez, nenhuma coloração é observada. A figura 44 demonstra, didática e simplificada, estes processos de acoplamento entre as microestruturas, antígenos, anticorpos, e as moléculas marcadoras.



**Figura 44 – Diagrama demonstrativo do processo de detecção de anticorpos de HIV, utilizando-se a Ficoeritrina como molécula marcadora. Neste caso, representa-se um resultado positivo para HIV.**



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para facilitar a compreensão e a discussão dos resultados obtidos neste trabalho, estes serão expostos em ordem diferente da realizada, a fim de facilitar a compreensão dos conceitos abordados e das medidas realizadas. Assim, neste capítulo será exposta a caracterização dos polímeros utilizados em função da massa molar, considerando a morfologia das estruturas depositadas, as características reológicas das soluções utilizadas, e a análise química superficial dos materiais produzidos. Por último, serão apresentados os resultados dos testes de confirmação da presença de hidroxilas na superfície do polímero funcionalizado, assim como os ensaios de detecção biológica, mais precisamente de antígenos de HIV em amostras de sangue contaminadas.

### 4.1. MASSA MOLAR DOS POLÍMEROS

Neste tópico são apresentados os resultados das medidas de massa molar dos polímeros utilizados, obtidos através da técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC).

#### 4.1.1. PMMA CAST

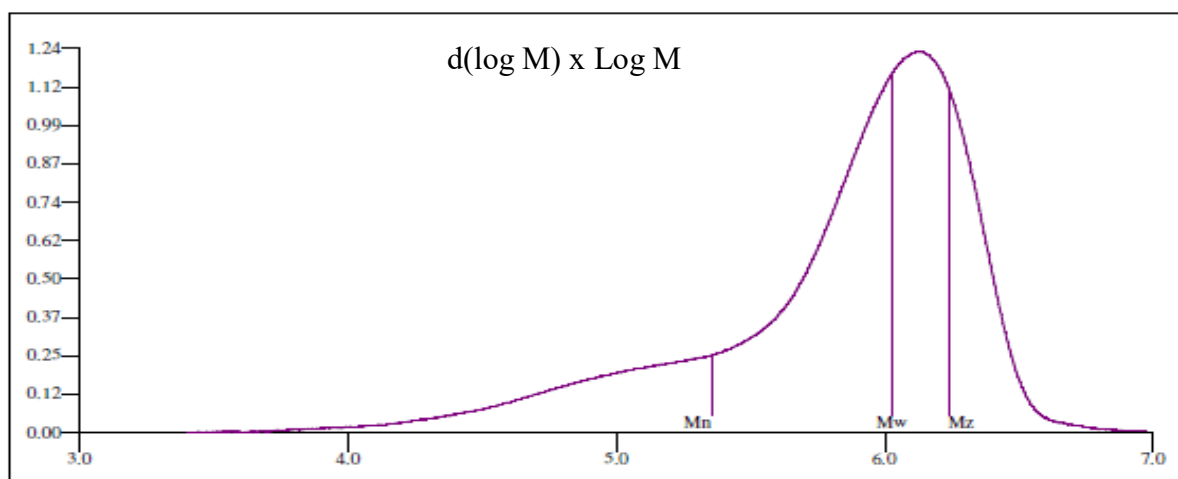


Figura 45 - Distribuição de massas molares obtida por GPC.

Como toda medida de cromatografia de permeação em gel, a medida é exibida como uma distribuição de massas molares. Assim, é possível perceber que a maior parte das cadeias poliméricas aferidas apresenta valores pouco acima de  $1,0 \times 10^6$  g/mol ( $\log 10^6 = 6,0$ ). Através do uso das equações expostas na figura 31 foram calculados os valores de  $M_w$ ,  $M_n$  e  $M_w/M_n$ .

**Tabela 5 – Valores de diferentes massas molares obtidas por GPC, além do índice de polidispersidade.**

$M_w$	$1,06 \times 10^6 \text{ g/mol}$
$M_n$	$2,32 \times 10^5 \text{ g/mol}$
$M_w / M_n$	4,07

O elevado valor de  $M_w$ , quando comparado com a maioria dos polímeros sintéticos disponíveis no mercado, é esperado e justificado pelo método de polimerização utilizado. Conforme já discutido, a técnica de *cell casting* (assim como a presença de aditivos industriais), acaba por favorecer um aumento no número de ligações cruzadas entre as macromoléculas do polímero, o que propicia a produção de cadeias poliméricas gigantescas, além de um alto valor de polidispersidade.

#### 4.1.2. PMMA SIGMA

Não foram realizadas medidas de massa molar deste polímero, pois o próprio fabricante especifica o valor médio de 996.000 g/mol ( $M_w$ ), também obtido através da *técnica GPC*. Entretanto, para este trabalho, tal precisão não se faz necessária, já que o valor nominal da massa molar, neste caso, serve apenas como comparação com o PMMA *cast*.

## 4.2. MORFOLOGIA DAS ESTRUTURAS DEPOSITADAS

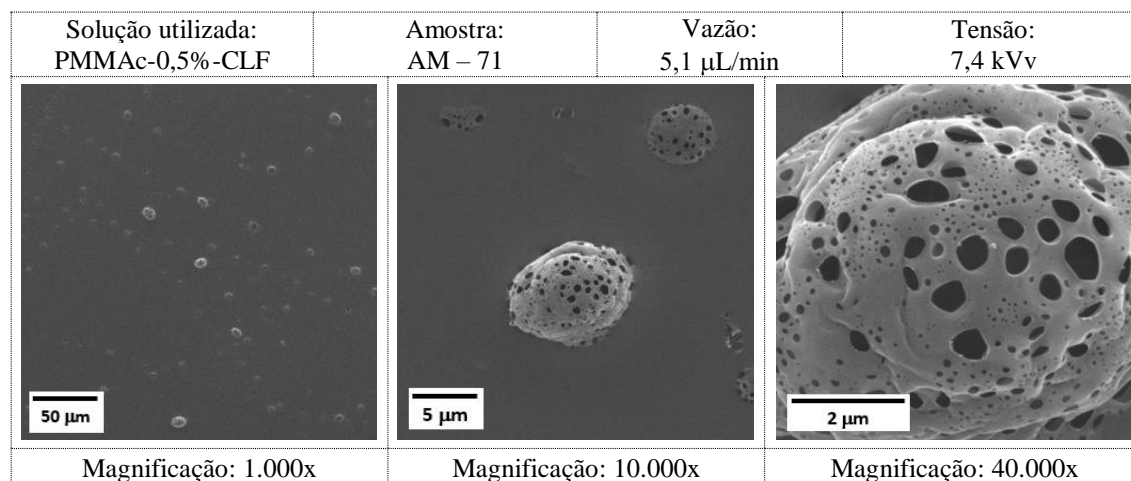
A técnica de MEV foi utilizada para analisar a morfologia das estruturas depositadas. Para facilitar a discussão sobre a homogeneidade das estruturas depositadas sem perda de detalhes nano/micrométricos da superfície das mesmas, as amostras foram caracterizadas em três aumentos diferentes (1.000x, 10.000x e 40.000x). Mantendo estes aumentos constantes, assim como suas respectivas escalas, é possível comparar melhor as dimensões das estruturas.

O diâmetro médio dos fios depositados foi aferido com o software *ImageJ*®, e seus valores estão discriminados logo após suas respectivas imagens.

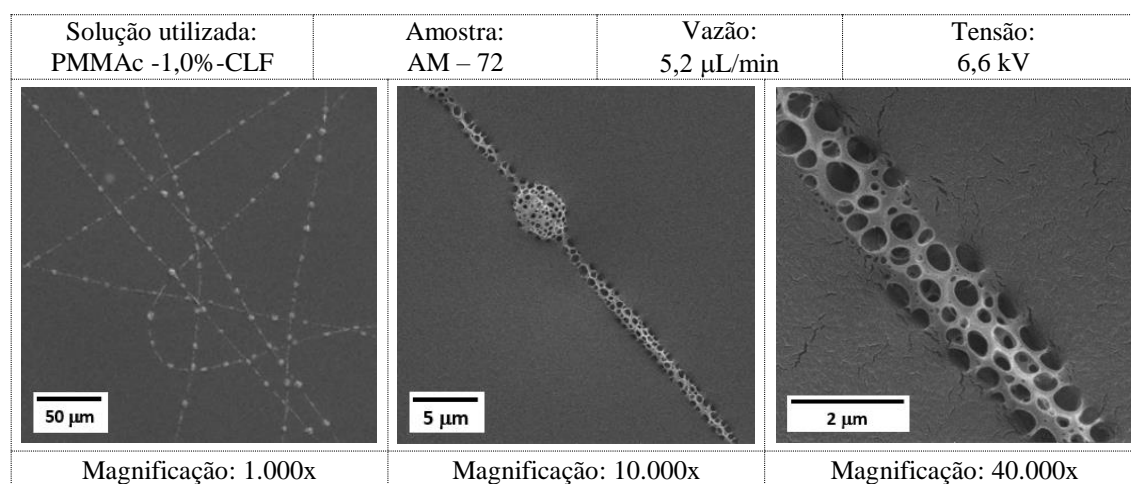
#### 4.2.1. PMMA CAST DEPOSITADO POR ELETROFIAÇÃO

Seguindo a ordem de trabalho realizada, optou-se pela deposição (primeiramente por Eletrofiação) e análise de estruturas compostas pelo PMMA *cast*, com os diferentes solventes.

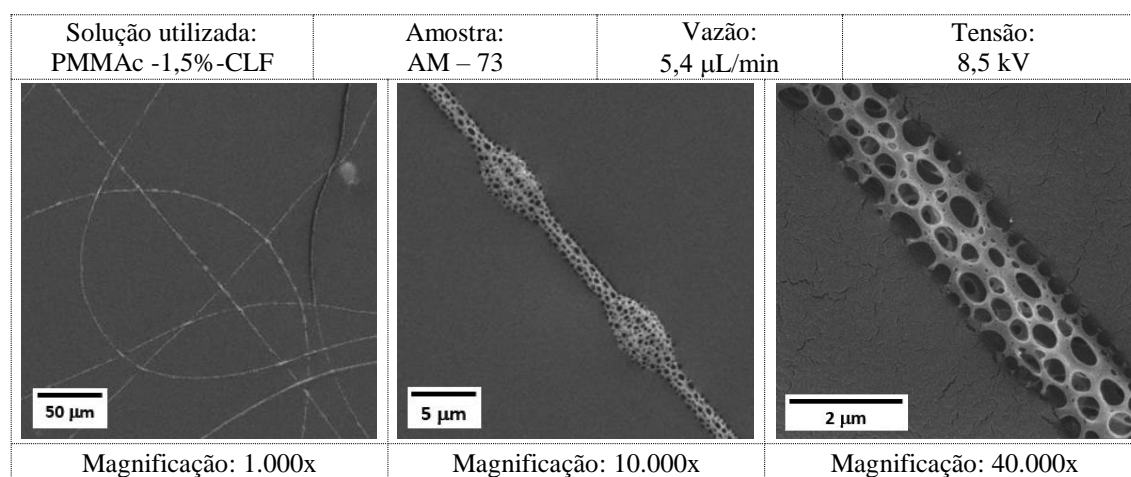
### Clorofórmio (CFL) como solvente



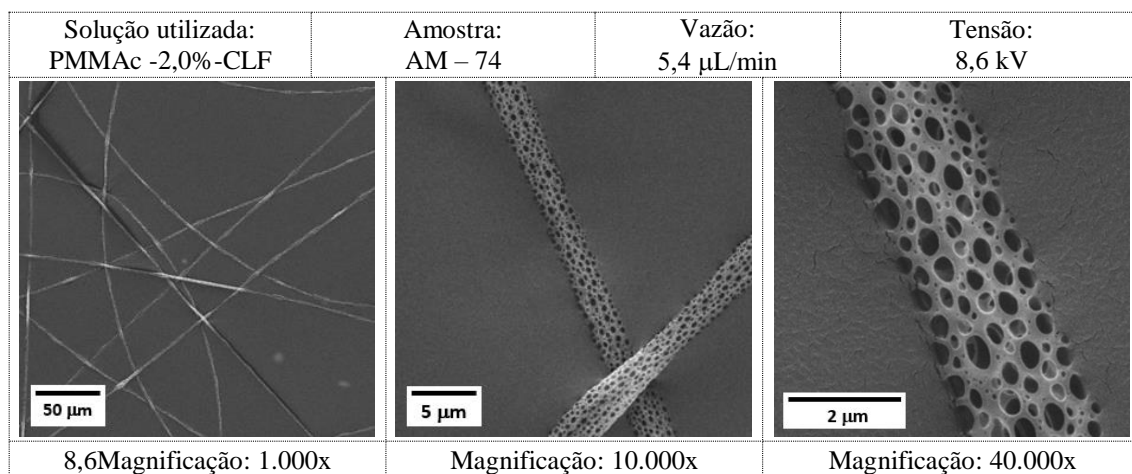
**Figura 46 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 0,5% de PMMA *cast* em CFL, com diferentes magnificações.**



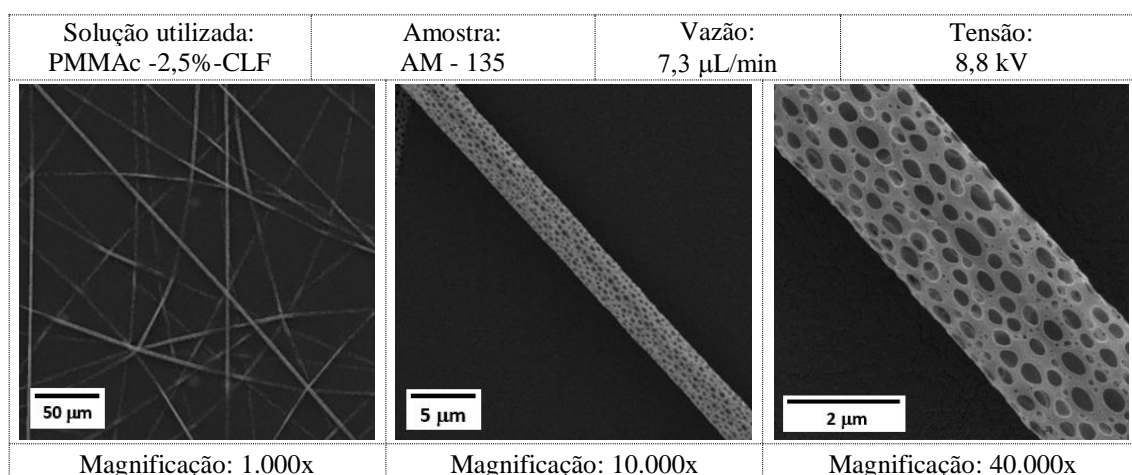
**Figura 47 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 1,0% de PMMA *cast* em CFL, com diferentes magnificações.**



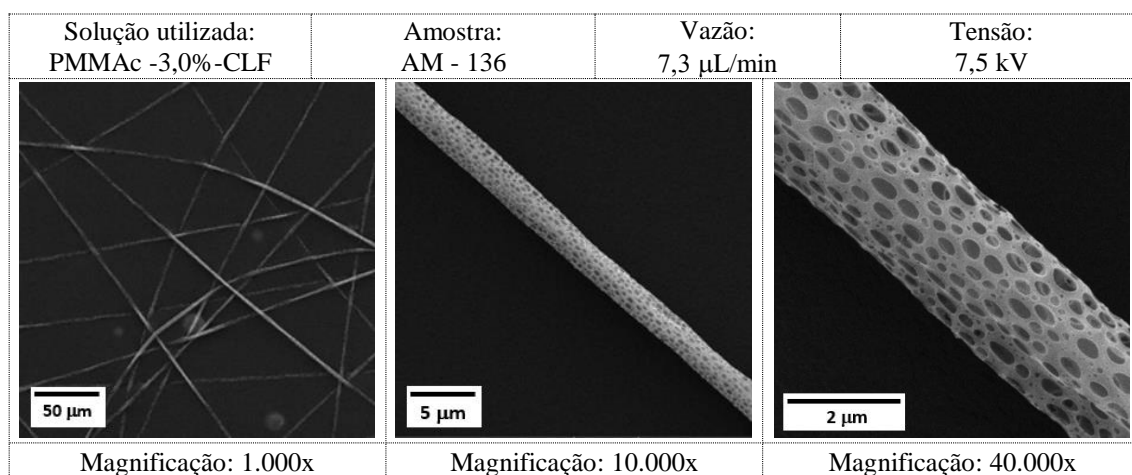
**Figura 48 – Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 1,5% de PMMA *cast* em CFL, com diferentes magnificações.**



**Figura 49 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 2,0% de PMMA *cast* em CLF, com diferentes magnificações.**



**Figura 50 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 2,5% de PMMA *cast* em CLF, com diferentes magnificações.**



**Figura 51 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 3,0% de PMMA *cast* em CLF, com diferentes magnificações.**

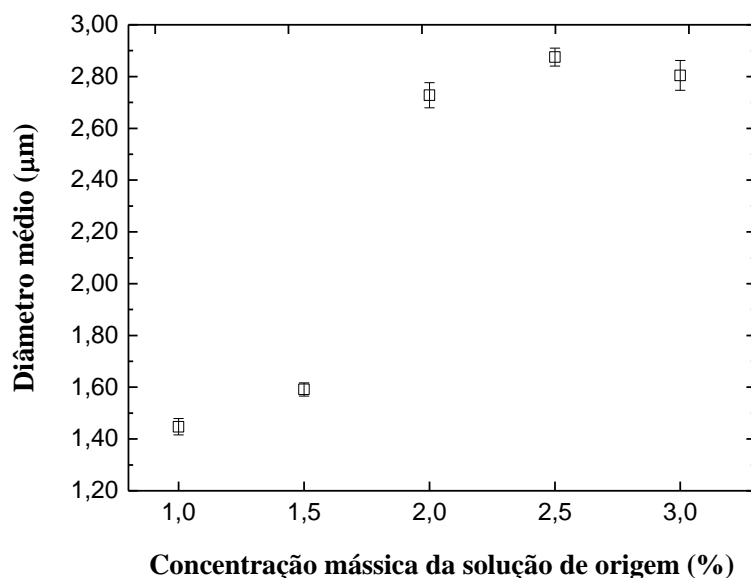
É possível perceber que, com a solução com 0,5% de concentração, pequenos esferóides porosos foram produzidos, com grande dispersão de tamanho. Com o aumento da concentração do polímero, entretanto, passou-se a produzir estruturas em forma de “colar de contas”, isto é, fios com esferas incorporadas. Esta característica é muito observada nas imagens referentes às soluções com 1,0% e 1,5% de concentração. As estruturas depositadas provenientes das soluções com 2,0%, 2,5% e 3,0% de concentração, todavia, apresentam forma de fios contínuos e ininterruptos, com grande porosidade. Ou seja, fica clara a relação entre a variação da quantidade de soluto na solução de origem e a modificação na morfologia das estruturas depositadas. Conforme discutido anteriormente, esta característica é amplamente conhecida na literatura da área, e deve-se ao fato de que ao alterar a quantidade de polímero na solução, altera-se a interação entre as moléculas da mesma, resultando em variação nos valores de viscosidade de tal solução. Esta característica influi então diretamente no comportamento do polímero no processo de evaporação de solvente, durante a deposição, conforme exposto na tabela 2. Já a grande presença de poros, conforme também já abordado anteriormente, deve-se ao alto valor de pressão de vapor do Clorofórmio (25,9 kPa), aqui utilizado como solvente.

É possível perceber ainda que algumas estruturas parecem estar “apagadas”. Isso ocorre devido à presença de cola sobre a fita dupla face utilizada como substrato. Embora tal efeito não seja desejado, também não gera quaisquer dificuldades na caracterização das amostras. Assim, a fim de manter um padrão no aparato experimental, optou-se por não realizar nenhuma mudança no processo. Além do mais, tal problema pode ser aqui evidenciado graças à deposição ocorrer por apenas 10 minutos, durante o processo de análise sobre qual concentração seria a ideal. É importante ressaltar, entretanto, que em futuros trabalhos esta cola deverá ser removida, a fim de evitar quaisquer possíveis complicações na caracterização das amostras.

Com o software *ImageJ*® uma breve análise do diâmetro médio aparente dos fios depositados foi realizada, com os resultados expostos na tabela 6:

**Tabela 6 - Valores de diâmetro médio dos fios depositados, em função da concentração de PMMA *cast*, com CLF como solvente.**

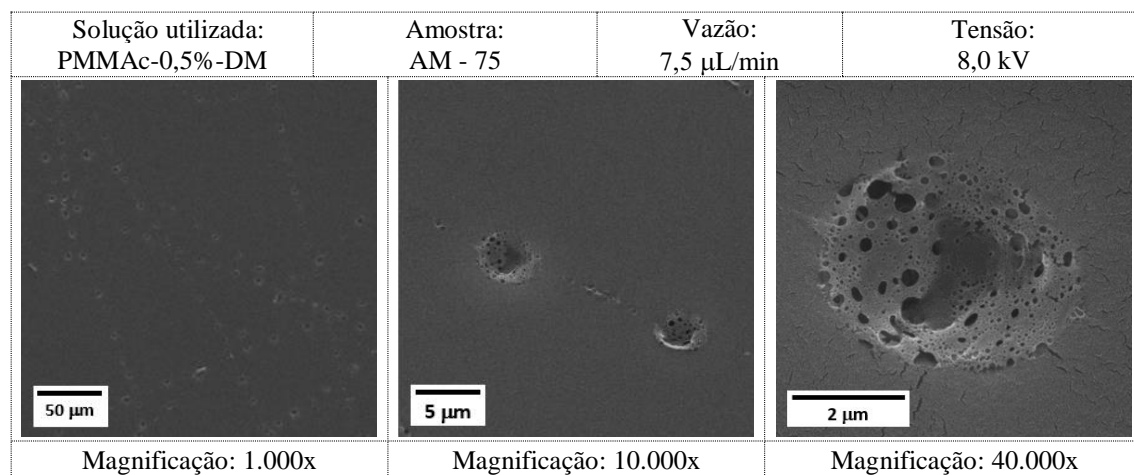
CLF	1,0%	1,5%	2,0%	2,5%	3,0%
Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )	1,45	1,60	2,72	2,88	2,80
Desvio padrão da média ( $\mu\text{m}$ )	0,03	0,03	0,05	0,03	0,06
Diâmetro mínimo ( $\mu\text{m}$ )	1,09	1,19	2,16	2,36	2,07
Diâmetro máximo ( $\mu\text{m}$ )	1,96	1,98	3,47	3,29	3,44
Contagem	50				



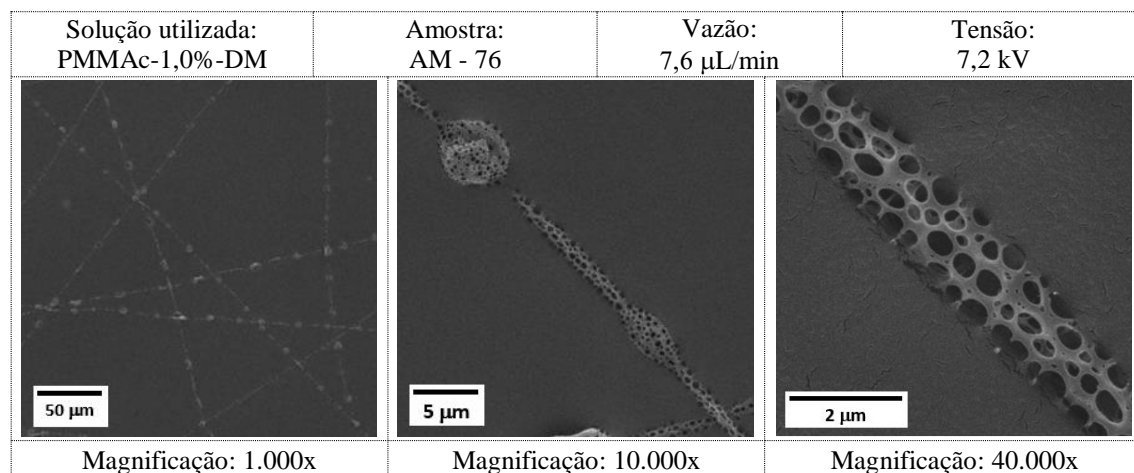
**Figura 52 - Diâmetro médio dos fios produzidos, de soluções com diferentes concentrações.**

Ao analisar o gráfico da figura 52, observa-se que as soluções com concentrações de 2,0%, 2,5% e 3,0% deram origem a estruturas em forma de fios com diâmetros muito maiores que as outras, com valores médios de 2,72  $\mu\text{m}$ , 2,88  $\mu\text{m}$  e 2,80  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Já em relação ao desvio padrão da média destas medidas (barra de “erro”), entretanto, podemos perceber que as amostras provenientes das soluções com maiores concentrações (2,0% e 3,0%, respectivamente) encontram-se no mesmo patamar, sendo impossível afirmar que a solução com 2,5% de concentração de fato deu origem a estruturas com maiores diâmetros. Fica claro, ainda, que as amostras depositadas provenientes da solução com 3,0% de concentração (a maior aqui utilizada) foram as que apresentaram maior dispersão de tamanho (maior valor de desvio padrão da média). Este fato, embora comum na literatura, é indesejado, já que acaba por limitar o controle mais preciso sobre a morfologia das estruturas produzidas.

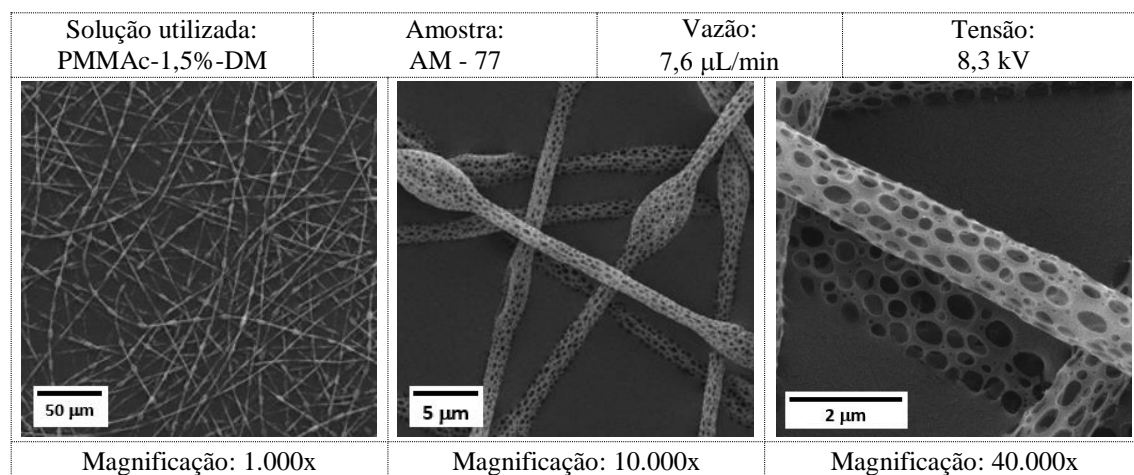
### Diclorometano (DM) como solvente



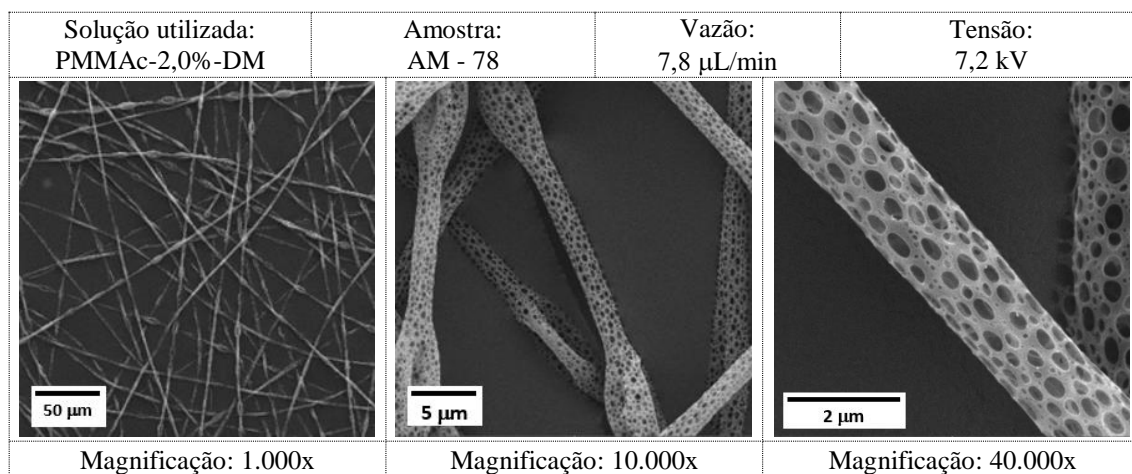
**Figura 53 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 0,5% de PMMA *cast* em DM, com diferentes magnificações.**



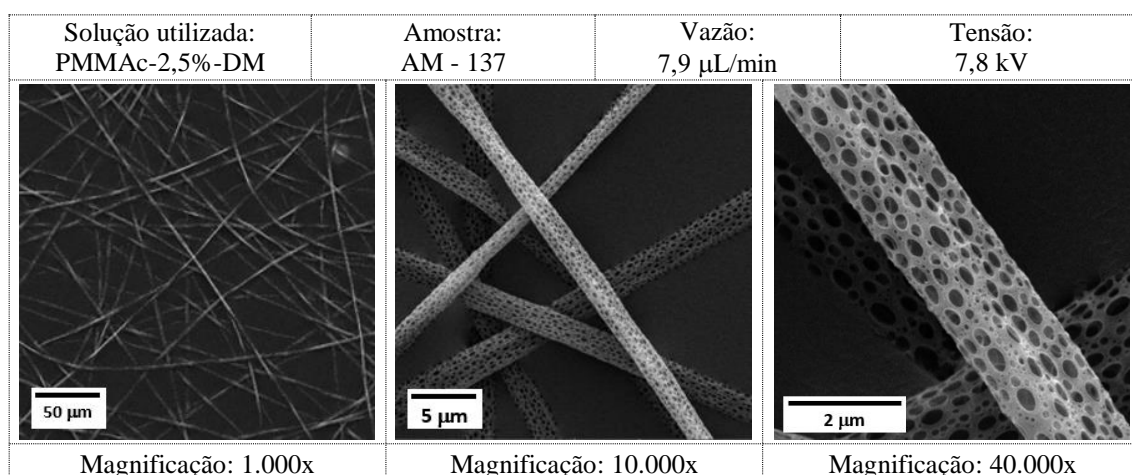
**Figura 54 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 1,0% de PMMA *cast* em DM, com diferentes magnificações.**



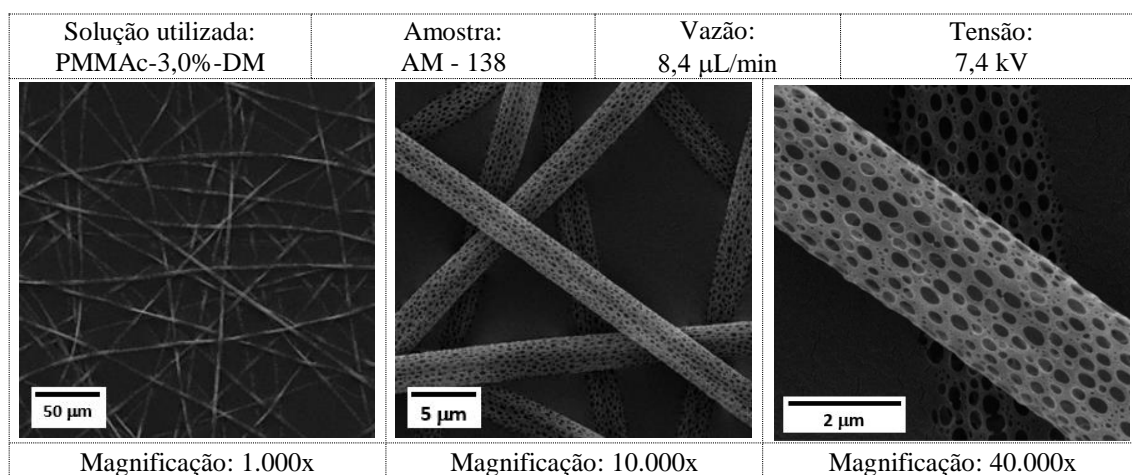
**Figura 55 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 1,5% de PMMA *cast* em DM, com diferentes magnificações.**



**Figura 56 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 2,0% de PMMA *cast* em DM, com diferentes magnificações.**



**Figura 57 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 2,5% de PMMA *cast* em DM, com diferentes magnificações.**



**Figura 58 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 3,0% de PMMA *cast* em DM, com diferentes magnificações.**

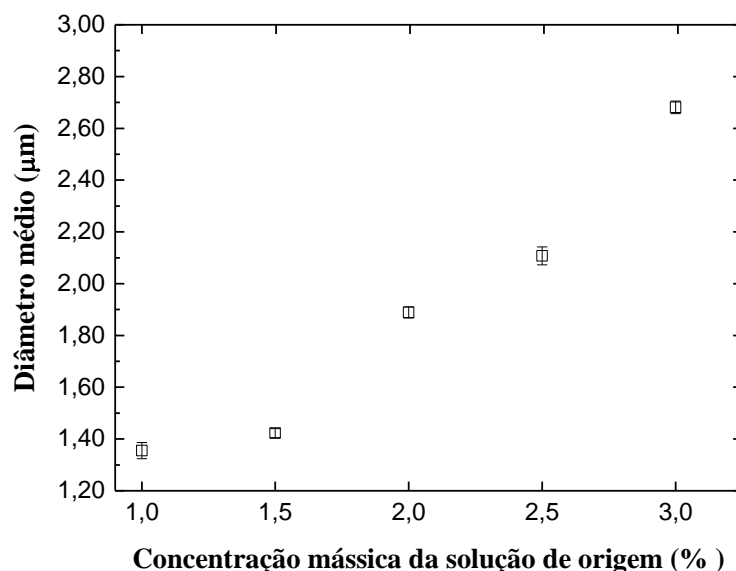


Pode-se perceber que as estruturas são muito parecidas com as anteriores (Clorofórmio como solvente), na qual as soluções de 0,5% e 1,0% deram origem à estruturas esferoides e em forma de “colar de contas”, respectivamente. Essa característica é mais uma vez creditada à interação entre as moléculas do soluto durante o processo de deposição, conforme já discutido. Assim como no caso anterior, nota-se que utilizando as soluções com 2,5% e 3,0% de concentração foram produzidos fios homogêneos e contínuos. O fato de somente algumas soluções darem origem à estas estruturas tem relação direta com o comportamento reológico (viscosimetria) das soluções utilizadas, e, portanto, será discutido no tópico 4.3 (Viscosidade das soluções). Um padrão que se repete em todas as amostras, neste caso, é a altíssima porosidade de todas as estruturas depositadas. Assim como as amostras provenientes de soluções que tiveram o Clorofórmio como solvente (caso anterior), nesta característica é mais uma vez condizente com a elevada pressão de vapor do Diclorometano (57,3 kPa), conforme também já discutido. É importante salientar, também, um aumento na quantidade de fios produzidos, durante os mesmos 10 minutos de deposição. Esta característica é de extrema importância na futura aplicabilidade do material, pois um aumento na produtividade das estruturas depositadas é sempre desejado.

Os valores de diâmetro médio das estruturas depositadas pode ser observada na tabela 7:

**Tabela 7 - Valores de diâmetro médio dos fios depositados, em função da concentração de PMMA *cast*, com DM como solvente.**

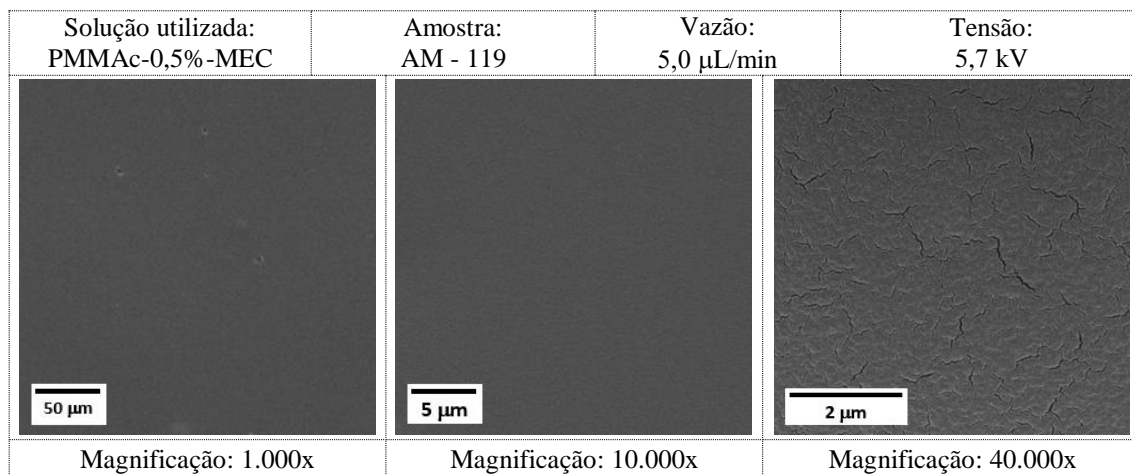
DM	1,0%	1,5%	2,0%	2,5%	3,0%
Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )	1,36	1,42	1,89	2,11	2,68
Desvio padrão da média ( $\mu\text{m}$ )	0,03	0,02	0,02	0,04	0,03
Diâmetro mínimo ( $\mu\text{m}$ )	0,96	1,13	1,66	1,64	2,31
Diâmetro máximo ( $\mu\text{m}$ )	1,97	1,71	2,25	2,61	2,90
Contagem	50				



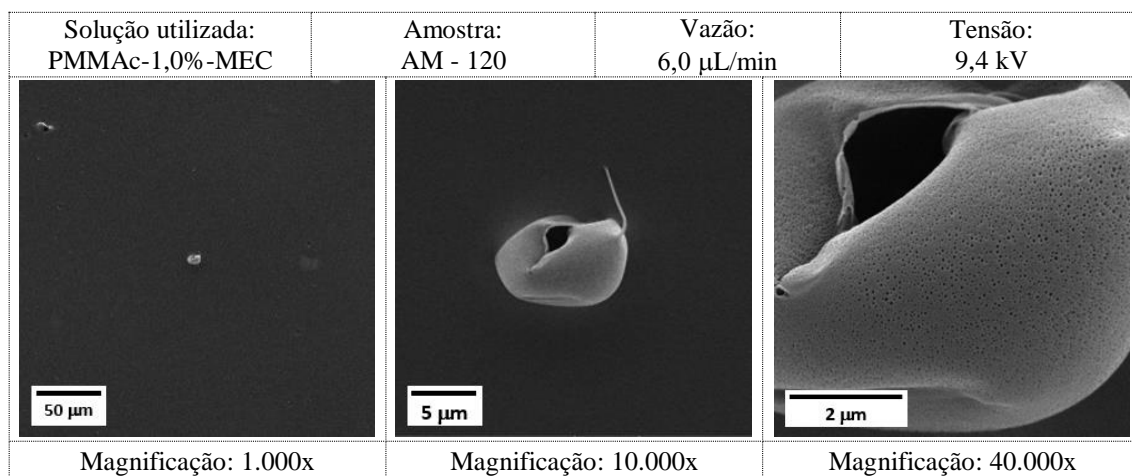
**Figura 59 - Diâmetro médio dos fios produzidos, de soluções com diferentes concentrações.**

O diâmetro das estruturas em forma de fio depositadas, por sua vez, se mostrou menor que no caso anterior (quando o Clorofórmio foi utilizado como solvente), sendo que a maior medida foi observada em amostras provenientes da deposição de solução com 3,0% de concentração (2,68  $\mu\text{m}$ ). Além disso, ao analisar os valores de desvio padrão da média das referidas medidas, percebe-se uma menor dispersão de tamanho entre as microestruturas depositadas (sempre entre 0,02 e 0,04  $\mu\text{m}$ ). Isto acaba por influenciar também na linearidade observada no gráfico da figura 59, no qual fica claro que o aumento na concentração de soluto acaba por implicar no aumento do diâmetro médio das estruturas depositadas. Tanto a redução da morfologia (e dispersão) quanto esta linearidade podem indicar uma melhor compatibilidade entre polímero-solvente, que também será mais profundamente discutida no tópico 4.3 (Viscosidade das soluções).

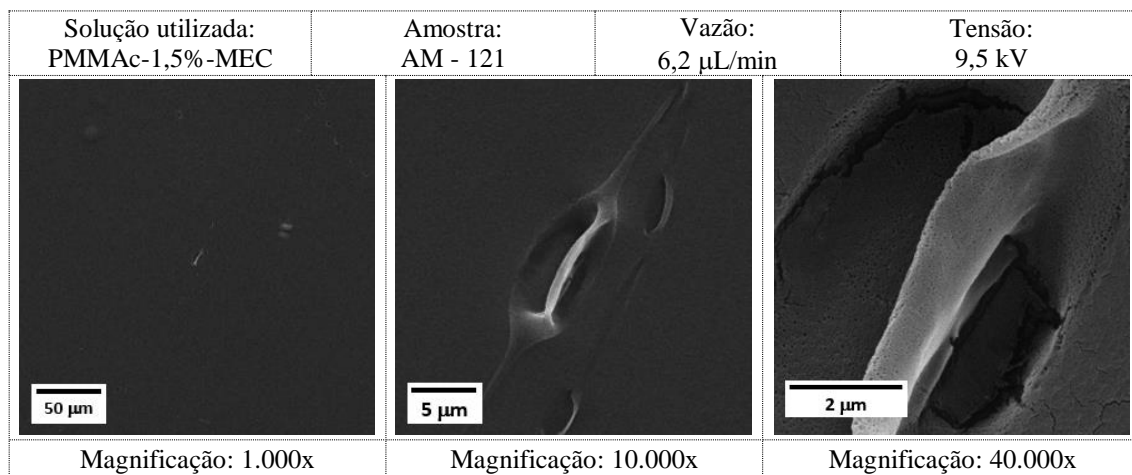
Metiletilcetona (MEC) como solvente



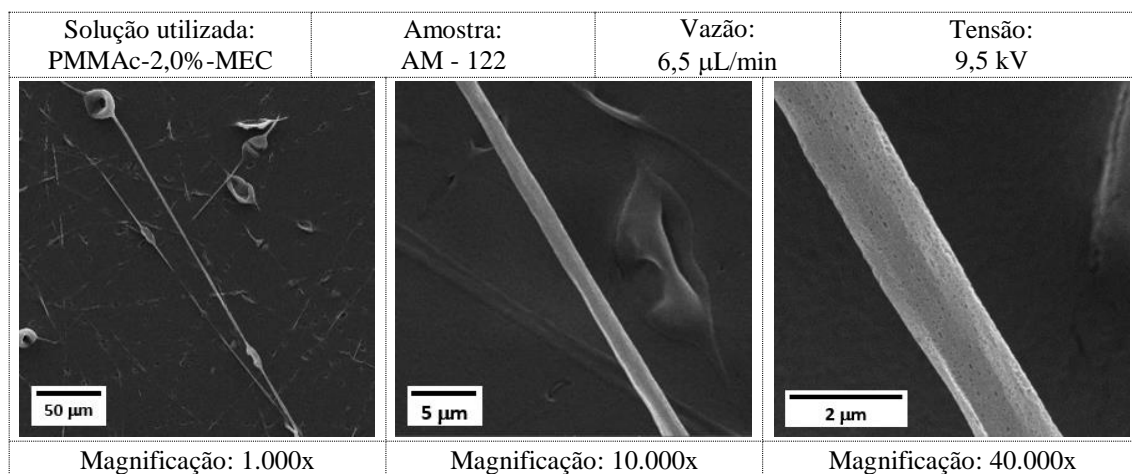
**Figura 60 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 0,5% de PMMA *cast* em MEC, com diferentes magnificações.**



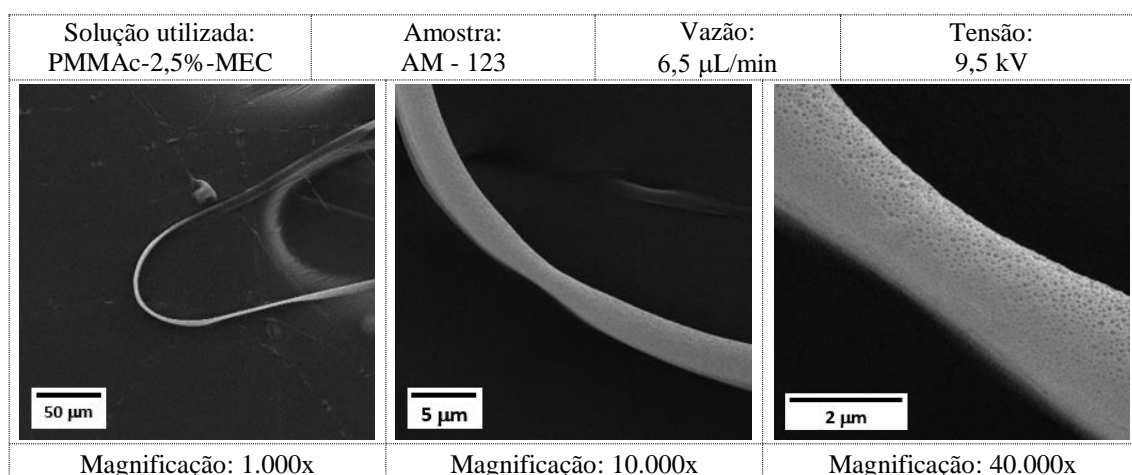
**Figura 61 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 1,0% de PMMA *cast* em MEC, com diferentes magnificações.**



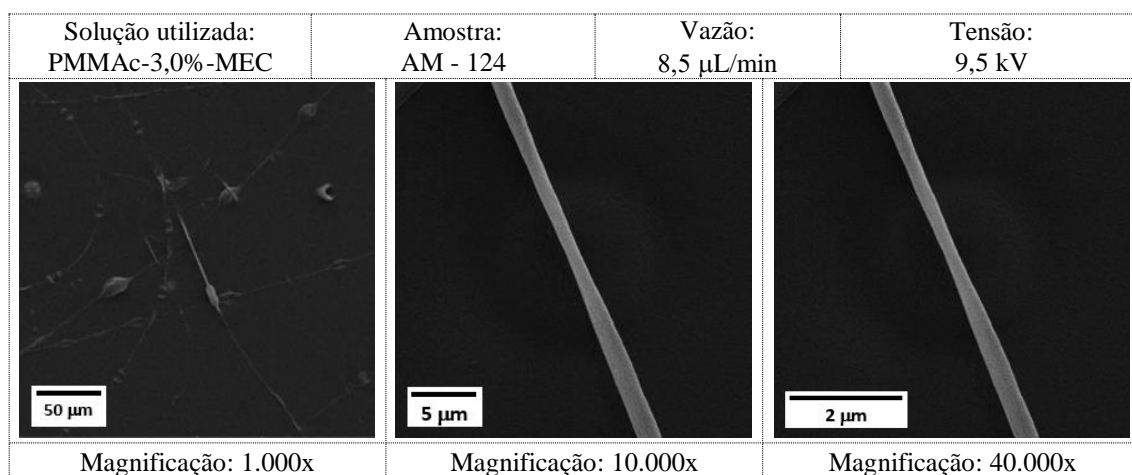
**Figura 62 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 1,5% de PMMA *cast* em MEC, com diferentes magnificações.**



**Figura 63 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 2,0% de PMMA *cast* em MEC, com diferentes magnificações.**



**Figura 64 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 2,5% de PMMA *cast* em MEC, com diferentes magnificações.**

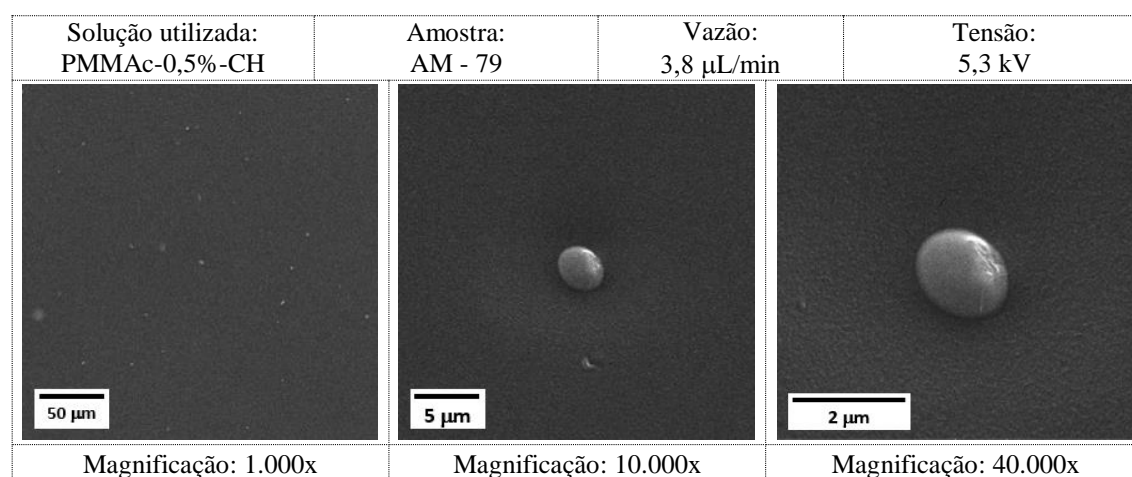


**Figura 65 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 3,0% de PMMA *cast* em MEC, com diferentes magnificações.**

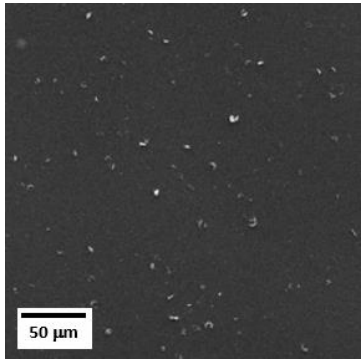
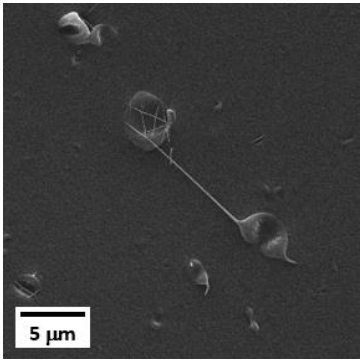
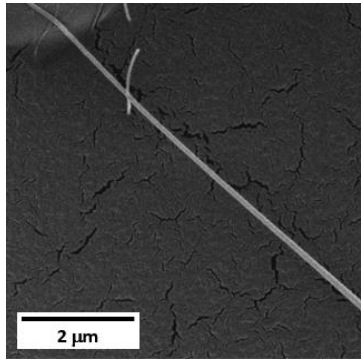
Diferentemente dos casos anteriores, o processo de deposição de estruturas de PMMA utilizando Metiletilcetona como solvente apresentou baixa qualidade. A solução com 0,5% de concentração, inclusive, não produziu quaisquer estruturas. A solução com 1,0% de concentração, por sua vez, deu origem a pequenas (e poucas) estruturas disformes, com média porosidade. Somente a partir da concentração de 2,0% é que estruturas com forma de contas alongadas puderam ser observadas, e ainda assim em menor quantidade e qualidade de reprodutibilidade. Mesmo a solução com 3,0% de concentração não produziu fios contínuos e homogêneos. Para entender a grande diferença na morfologia das estruturas aqui produzidas (em relação à utilização das soluções com Clorofórmio e Diclorometano como solvente) faz-se necessária a análise reológica destas soluções (abordada no tópico 4.3), que permite uma melhor discussão acerca da interação solvente-polímero, a principal responsável por esta expressiva diferença.

Graças ao pouquíssimo material depositado, concluiu-se que a medida de diâmetro médio de fios não faria qualquer sentido. Ficou claro, então, que a utilização de Metiletilcetona como solvente, nesta faixa de concentração (0,5% a 3,0%) deveria ser descartada.

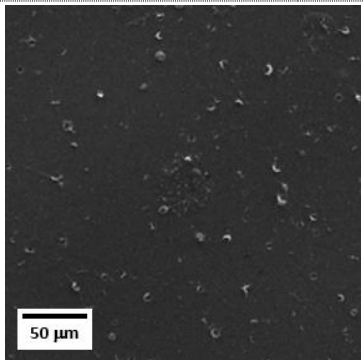
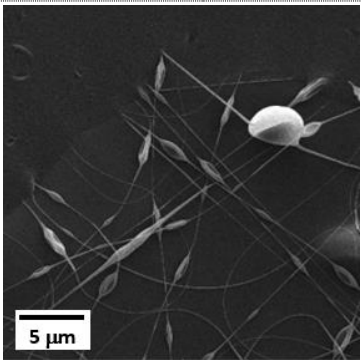
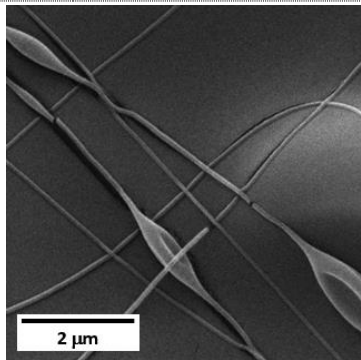
#### Ciclohexanona (CH) como solvente



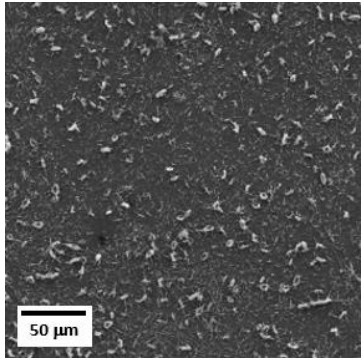
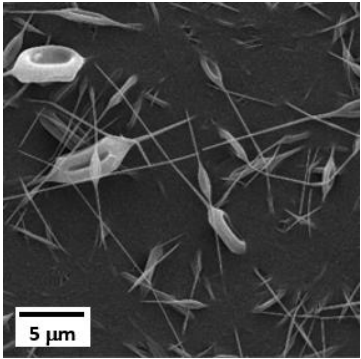
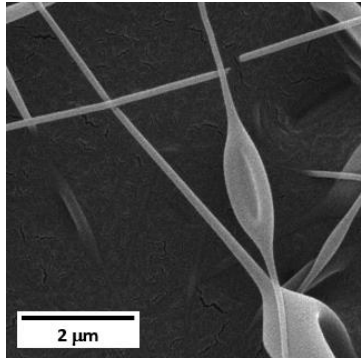
**Figura 66- Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 0,5% de PMMA cast em CH, com diferentes magnificações.**

Solução utilizada: PMMAc-1,0%-CH	Amostra: AM - 80	Vazão: 3,8 $\mu\text{L}/\text{min}$	Tensão: 5,3 kV
			
Magnificação: 1.000x	Magnificação: 10.000x	Magnificação: 40.000x	

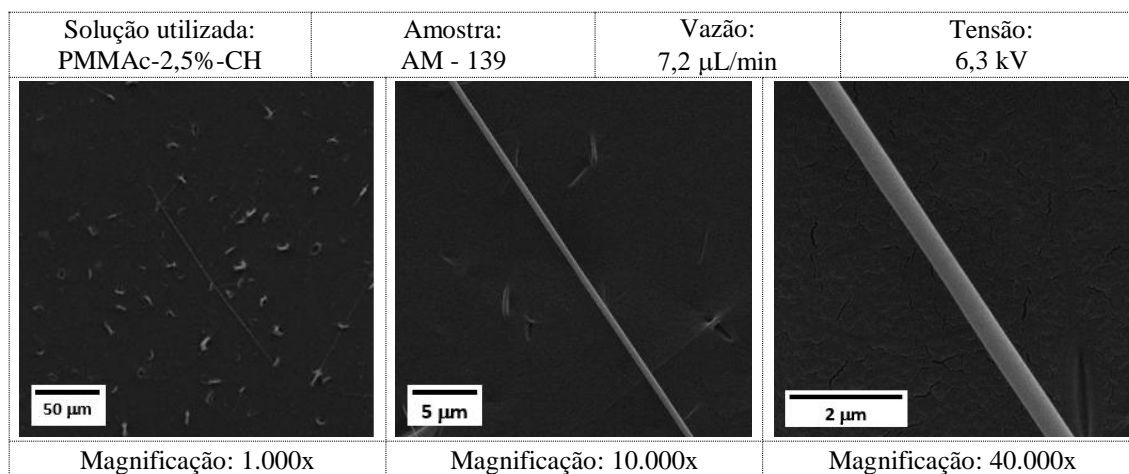
**Figura 67 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 1,0% de PMMA *cast* em CH, com diferentes magnificações.**

Solução utilizada: PMMAc-1,5%-CH	Amostra: AM - 81	Vazão: 3,5 $\mu\text{L}/\text{min}$	Tensão: 6,8 kV
			
Magnificação: 1.000x	Magnificação: 10.000x	Magnificação: 40.000x	

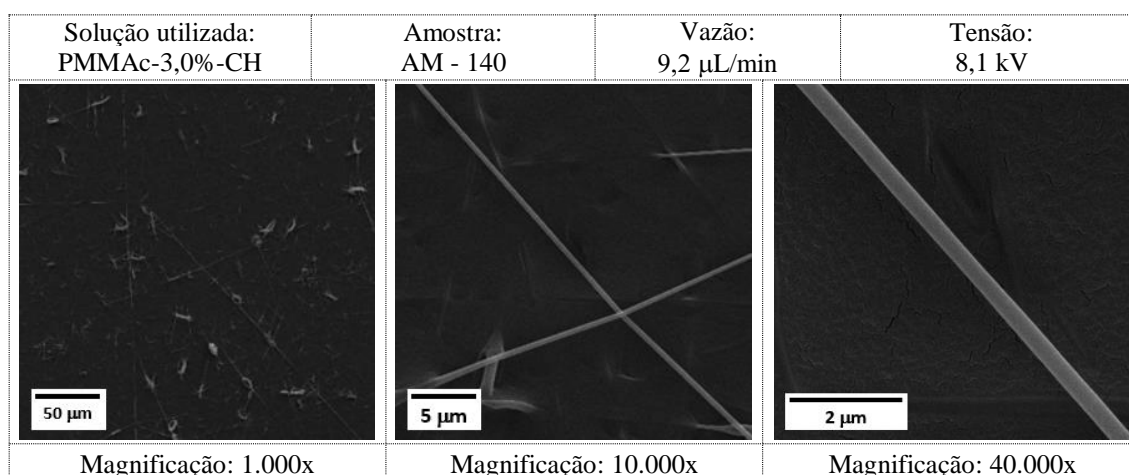
**Figura 68 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 1,5% de PMMA *cast* em CH, com diferentes magnificações.**

Solução utilizada: PMMAc-2,0%-CH	Amostra: AM - 82	Vazão: 3,5 $\mu\text{L}/\text{min}$	Tensão: 9,2 kV
			
Magnificação: 1.000x	Magnificação: 10.000x	Magnificação: 40.000x	

**Figura 69 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 2,0% de PMMA *cast* em CH, com diferentes magnificações.**



**Figura 70 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 2,5% de PMMA *cast* em CH, com diferentes magnificações.**



**Figura 71 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 3,0% de PMMA *cast* em CH, com diferentes magnificações.**

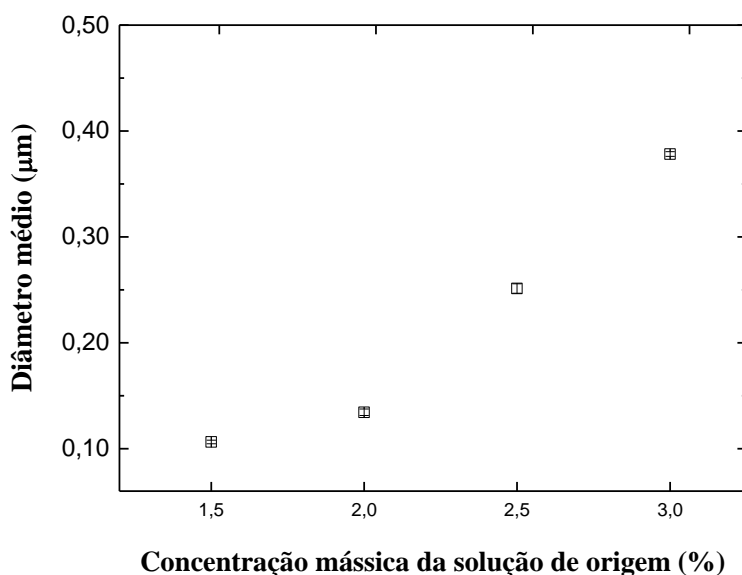
Embora as estruturas depositadas com Ciclohexanona como solvente não sejam comparáveis às depositadas no primeiro e segundo caso (Clorofórmio e Diclorometano como solventes, respectivamente), pode-se observar maior quantidade e reprodutibilidade do que no terceiro caso (Metiletilecetona como solvente). A partir da solução com 1,5% de concentração, principalmente, estruturas em forma de contas alongadas foram produzidas. Entretanto, é possível perceber que todas as amostras depositadas (com Ciclohexanona como solvente) apresentam estruturas disformes em grande quantidade. Este fato é extremamente ruim, pois em nenhum caso foram obtidas estruturas “limpas” em grande quantidade.

Dois fatores, entretanto, merecem destaque. Graças ao baixíssimo valor da pressão de vapor da Ciclohexanona (660 Pa), as estruturas depositadas apresentam ausência total de poros em sua superfície. Esta característica era esperada, e tem como função demonstrar a forte e

direta correlação entre pressão de vapor e porosidade, também em estruturas de PMMA. Além desta característica, pode-se observar também que todas as estruturas produzidas apresentam dimensões significativamente menores que nos casos anteriores (assim como menores valores de desvio padrão da média das medidas), conforme pode ser observado na tabela 8:

**Tabela 8 - Valores de diâmetro médio dos fios depositados, em função da concentração de PMMA *cast*, com CH como solvente.**

CH	1,5%	2,0%	2,5%	3,0%
Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )	0,11	0,13	0,25	0,38
Desvio padrão da média ( $\mu\text{m}$ )	0,002	0,003	0,005	0,002
Diâmetro mínimo ( $\mu\text{m}$ )	0,07	0,10	0,04	0,03
Diâmetro máximo ( $\mu\text{m}$ )	0,13	0,18	0,55	0,40
Contagem	50			



**Figura 72 - Diâmetro médio dos fios produzidos, de soluções com diferentes concentrações.**

O gráfico da figura 72 nos informa que, neste caso, o aumento da quantidade de polímero na solução acarreta em contínuo aumento no diâmetro médio das estruturas produzidas, sendo que a solução com maior concentração, mais uma vez, deu origem a estruturas com o maior valor de diâmetro médio (0,38  $\mu\text{m}$ ).

Embora fios com diâmetros menores possam implicar em maiores razões de área de contato por unidade de massa (em relação à estruturas maiores porém porosas), é importante ressaltar



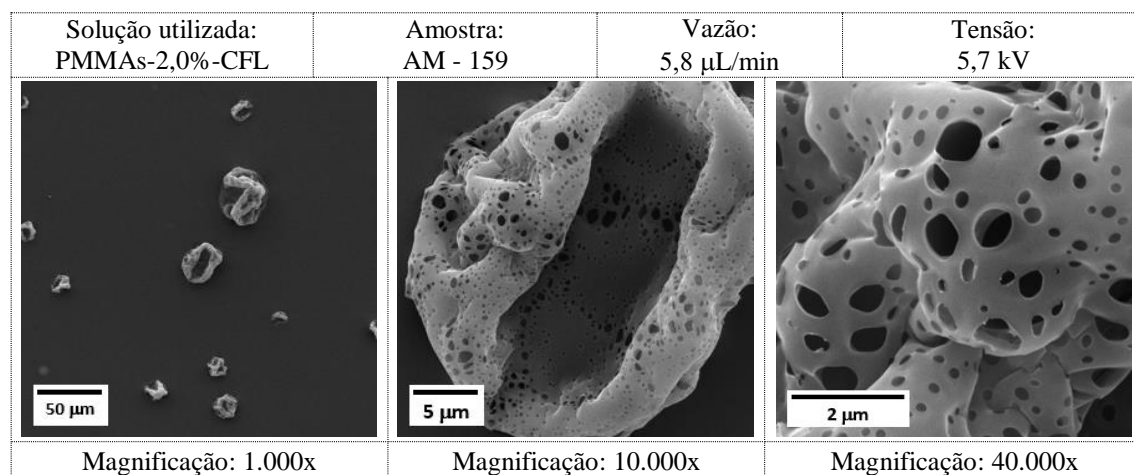
que, como observado nas imagens anteriores, as estruturas foram produzidas em quantidades muito menores do que nos primeiros casos (Clorofórmio e Diclorometano como solventes, respectivamente). Este fator é de extrema importância neste trabalho, já que as estruturas produzidas já possuem uma potencial aplicação definida. Assim, até o presente momento, a utilização de soluções contendo Ciclohexanona como solvente apresentou mais características negativas que positivas. Com isso, decidiu-se que o uso deste solvente neste trabalho não seria prático, tampouco eficiente.

Assim, dentre os solventes escolhidos no início deste trabalho somente o Clorofórmio e o Diclorometano mostraram-se úteis na produção de estruturas altamente porosas, com alta reprodutibilidade e homogeneidade. Todavia, conforme já discutido, o polímero aqui utilizado tem origem industrial, com presença de vários aditivos. Conforme visto na literatura da área, pequenas porcentagens de aditivos ( $< 0,5\%$ ), em alguns casos, podem afetar significativamente a morfologia das estruturas depositadas. Assim, julgou-se necessário realizar a deposição de outro tipo de PMMA, comercial e com confiável grau de pureza, para avaliar a real capacidade do polímero de produzir fios com significativa porosidade.

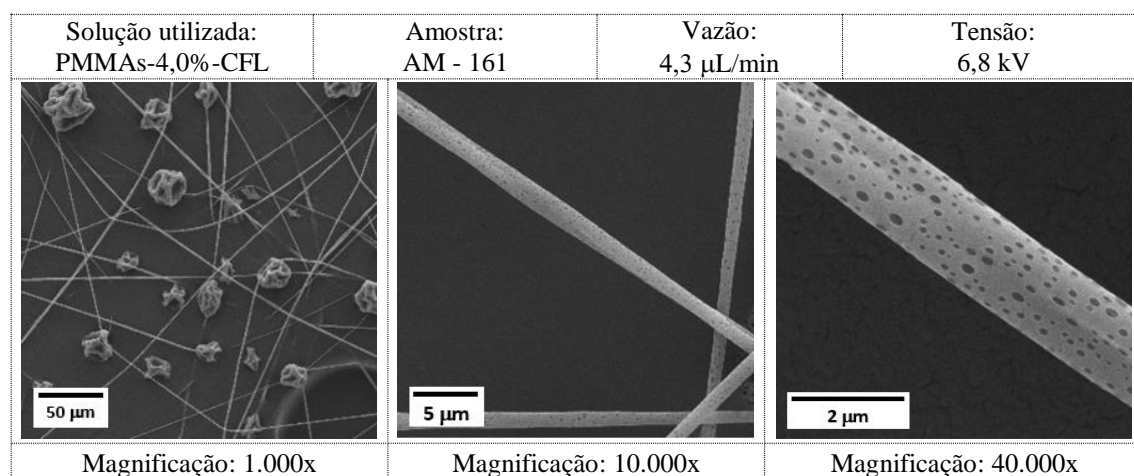
#### 4.2.2. PMMA SIGMA DEPOSITADO POR ELETROFIAÇÃO

Para avaliar a capacidade de produção de fios deste polímero, através da técnica de Eletrofiação, escolheu-se como solventes apenas Clorofórmio e Diclorometano, justamente pelos resultados positivos obtidos anteriormente neste trabalho. Como o PMMA Sigma já havia sido previamente utilizado em nosso laboratório, era sabido que a produção de fios micrométricos era obtida com soluções com concentrações mássicas em torno de 10,0%. Para caracterizar corretamente este parâmetro, optou-se por realizar deposições com concentrações de 2,0%, 4,0%, 6,0%, 8,0% e 10,0%, conforme já explicado anteriormente em ‘Materiais e métodos’.

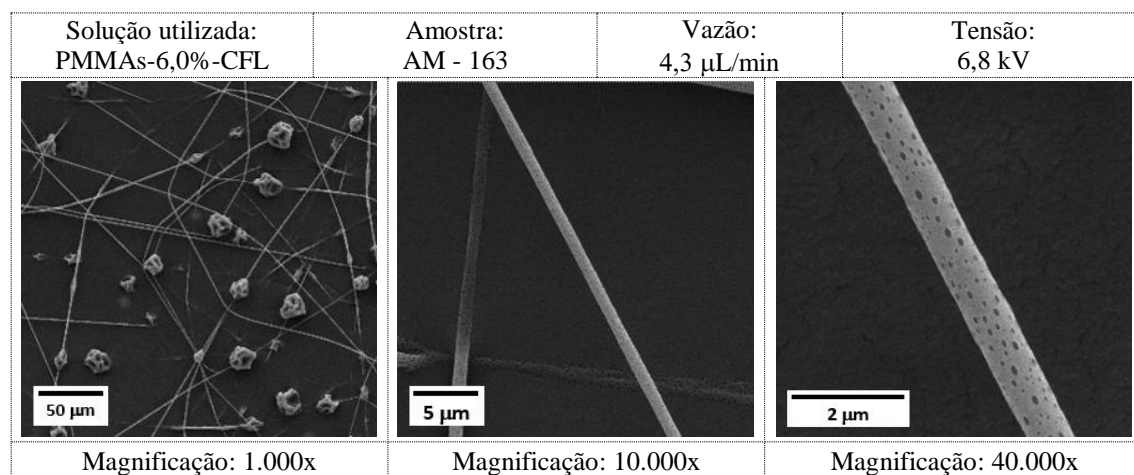
### Clorofórmio como solvente



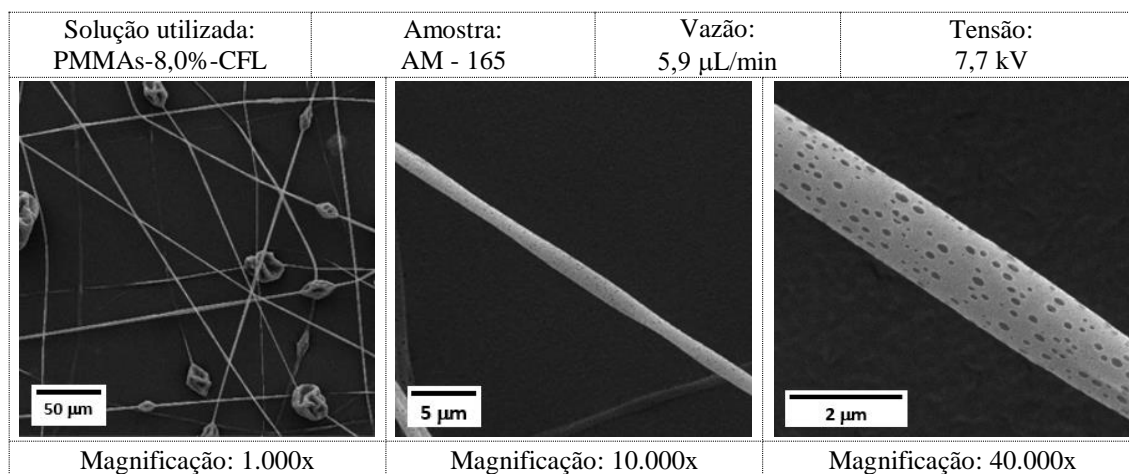
**Figura 73 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 2,0% de PMMA Sigma em CLF, com diferentes magnificações.**



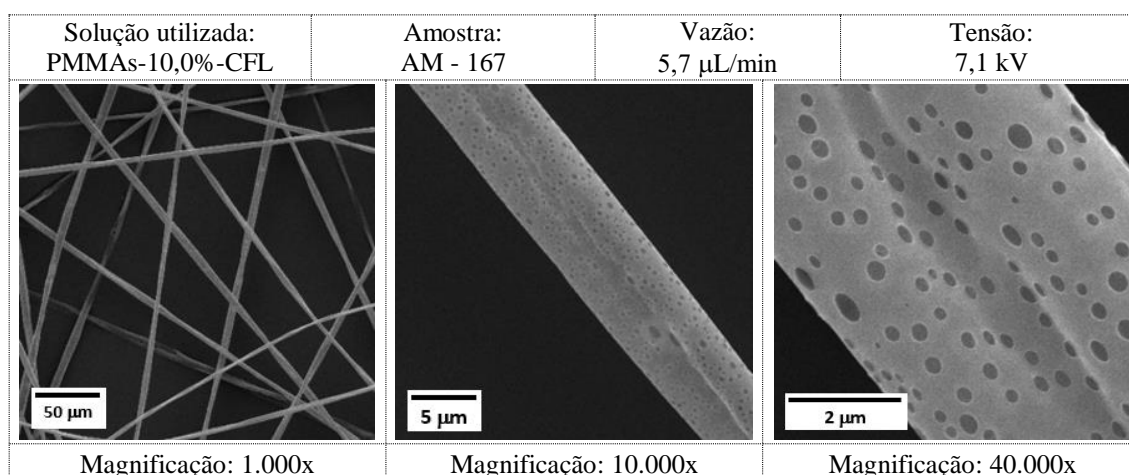
**Figura 74 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 4,0% de PMMA Sigma em CLF, com diferentes magnificações.**



**Figura 75 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 6,0% de PMMA Sigma em CLF, com diferentes magnificações.**



**Figura 76 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 8,0% de PMMA Sigma em CLF, com diferentes magnificações.**



**Figura 77 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 10,0% de PMMA Sigma em CLF, com diferentes magnificações.**

A análise das imagens de MEV das estruturas de PMMA Sigma depositadas evidencia as diferenças com os casos anteriores. A solução com 2,0% de concentração deu origem a estruturas “em forma de uvas passas”, com alta porosidade, enquanto a com 4,0% de concentração produziu tanto esferoides quanto fios, aparentemente em quantidades semelhantes. A solução com 6,0% de concentração apresentou características semelhantes, enquanto a com 8,0% de concentração, por sua vez, deu origem a fios com diâmetros micrométricos, mas ainda com outras estruturas em forma de “uvas passas” agregadas. Assim, somente a solução com 10,0% de concentração produziu fios contínuos e homogêneos.

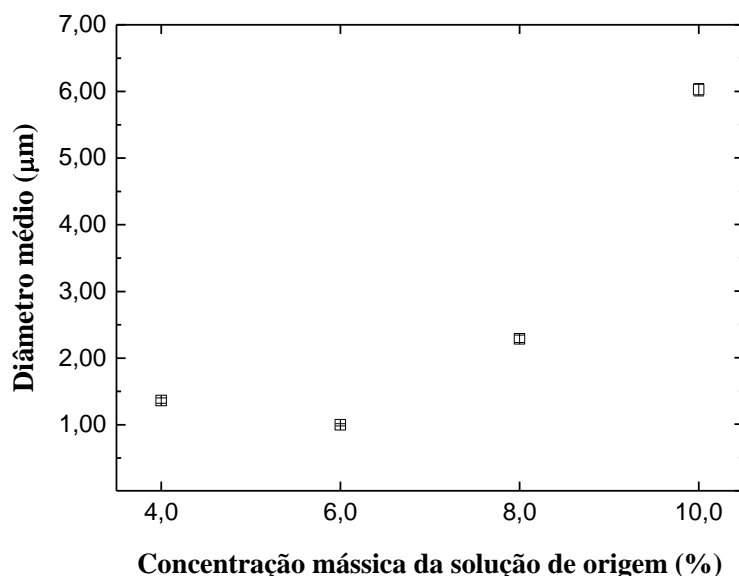
Quando comparadas com às soluções que utilizaram PMMA *cast* como solvente, obviamente a concentração necessária de polímero para dar origem a fios é, neste caso, muito superior. Este fato é aparentemente justificado pela ausência de aditivos químicos industriais

no PMMA Sigma, que provavelmente acaba permitindo uma melhor interação com as moléculas do solvente, neste caso o Clorofórmio. Assim, as interações entre polímero-solvente são mais favorecidas do que as interações polímero-polímero. Conforme poderá ser também visto nas análises reológicas (tópico 4.3), isso acaba por dificultar a formação de fios contínuos. Com isso faz-se necessário uma quantidade (concentração) muito maior de PMMA Sigma para que as interações polímero-polímero passem a de fato serem significativas, e, conseqüentemente, darem origem à microestruturas em forma de fios contínuos.

Neste caso a porosidade é claramente perceptível, mas não comparável à observada nas estruturas de PMMA *cast*. A justificativa para tal é, mais uma vez, a maior quantidade de soluto que em casos anteriores. Com mais polímero nestas soluções, durante o processo de separação de fase entre polímero e solvente que ocorre durante a deposição (efeito descrito no tópico ‘Parâmetros influenciadores na morfologia das estruturas depositadas’), os aglomerados de solvente que irão evaporar e dar origem aos poros são significativamente menores. Assim, uma menor porosidade é observada nas estruturas de PMMA Sigma depositadas. Os valores de diâmetro médio dos fios depositados podem então ser observados na tabela 9:

**Tabela 9 - Valores de diâmetro médio dos fios depositados, em função da concentração de PMMA Sigma, com CLF como solvente.**

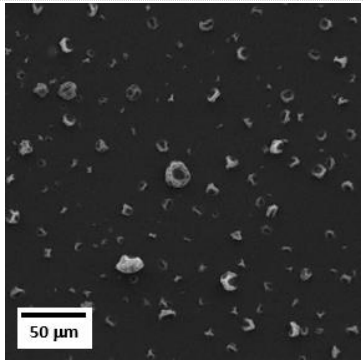
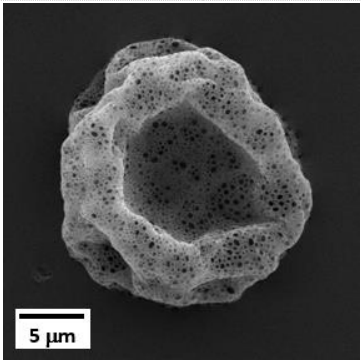
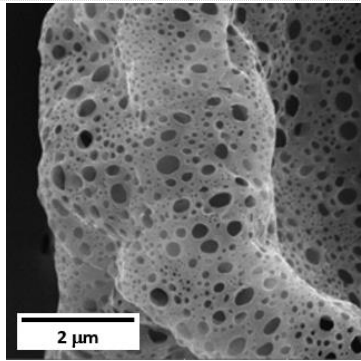
CLF	4,0%	6,0%	8,0%	10,0%
Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )	1,36	1,00	2,29	6,03
Desvio padrão da média ( $\mu\text{m}$ )	0,04	0,02	0,06	0,09
Diâmetro mínimo ( $\mu\text{m}$ )	0,82	0,80	1,65	4,49
Diâmetro máximo ( $\mu\text{m}$ )	2,04	1,34	3,22	7,32
Contagem	50			



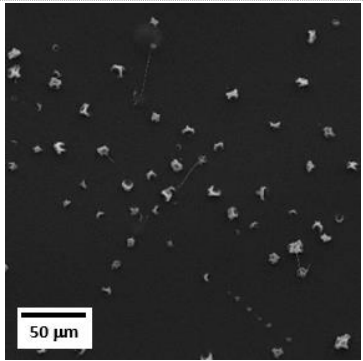
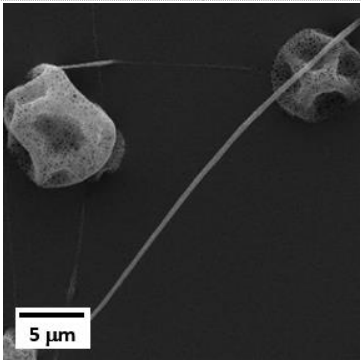
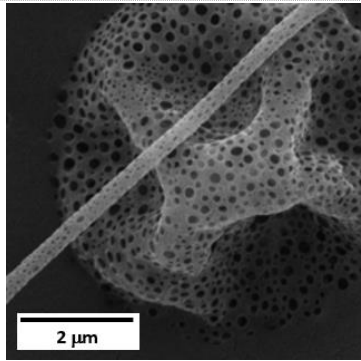
**Figura 78 - Diâmetro médio dos fios produzidos, de soluções com diferentes concentrações.**

A análise dos diâmetros médios demonstra que as estruturas depositadas com a solução com 6,0% de concentração apresentam diâmetros ligeiramente menores que a com 4,0%. Esta tendência, entretanto, não é observada nas soluções com maiores concentrações. A com 10,0% de concentração, inclusive, deu origem a fios com os maiores diâmetros já observados até aqui neste trabalho, de 6,03  $\mu\text{m}$ . Esta característica é consequência direta da grande quantidade de polímero utilizada. Em outras palavras, foi demonstrado que o processo de deposição das estruturas PMMA Sigma utilizando Clorofórmio como solvente é, na verdade, mais ineficiente (do que no caso com PMMA *cast* como soluto), pois mais material é necessário para produzir estruturas com maiores diâmetros e menores porosidades. Ou seja, estruturas com menores áreas superficiais.

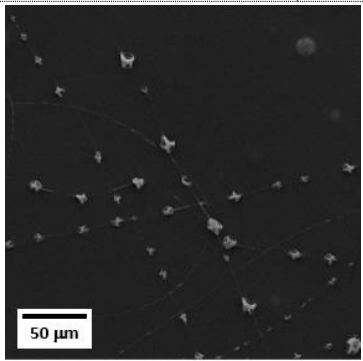
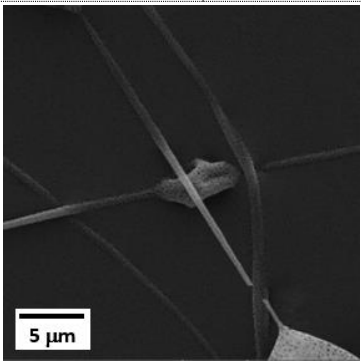
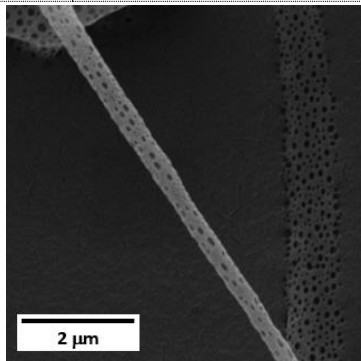
### Diclorometano como solvente

Solução utilizada: PMMA-2,0%-DM	Amostra: AM - 177	Vazão: 6,7 $\mu$ L/min	Tensão: 5,0 kV
			
Magnificação: 1.000x	Magnificação: 10.000x	Magnificação: 40.000x	

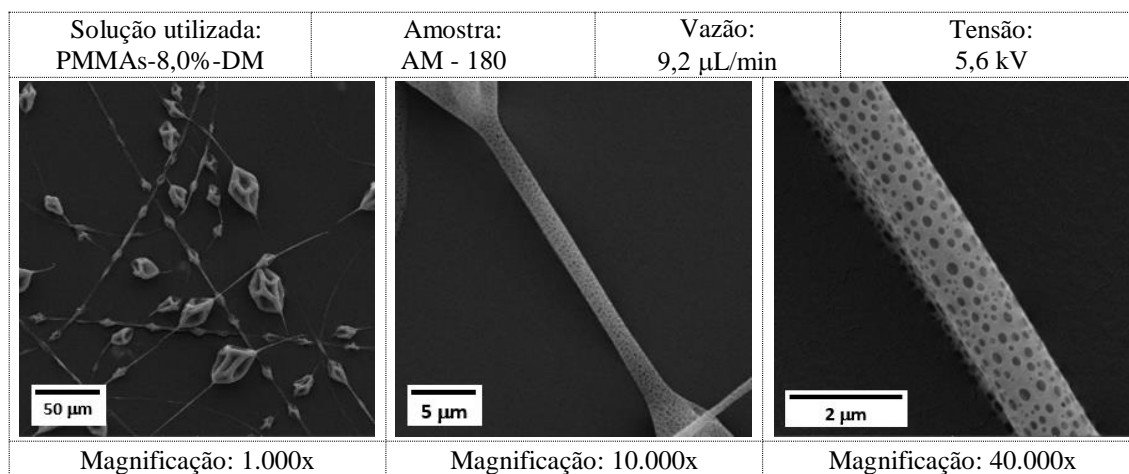
**Figura 79 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 2,0% de PMMA Sigma em DM, com diferentes magnificações.**

Solução utilizada: PMMA-4,0%-DM	Amostra: AM - 178	Vazão: 7,9 $\mu$ L/min	Tensão: 5,2 kV
			
Magnificação: 1.000x	Magnificação: 10.000x	Magnificação: 40.000x	

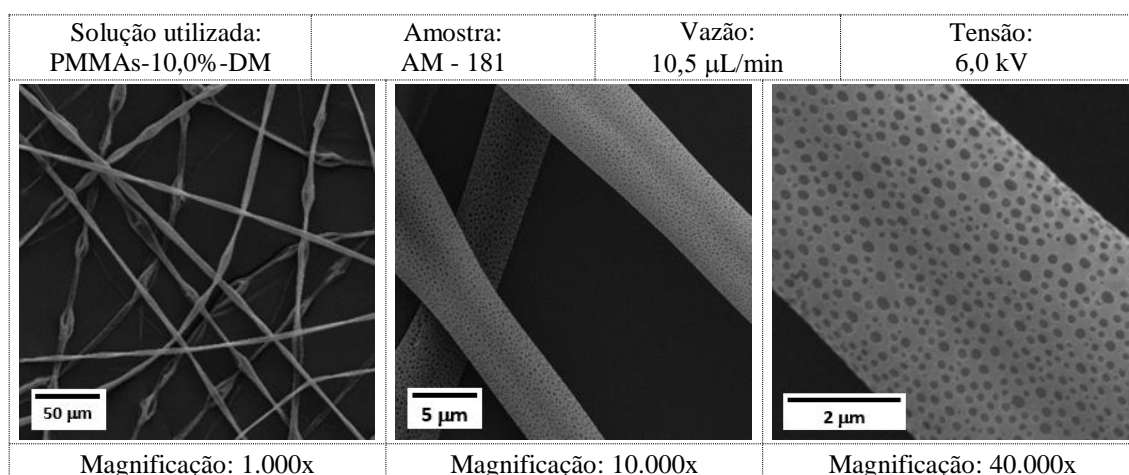
**Figura 80 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 4,0% de PMMA Sigma em DM, com diferentes magnificações.**

Solução utilizada: PMMA-6,0%-DM	Amostra: AM - 179	Vazão: 8,2 $\mu$ L/min	Tensão: 5,5 kV
			
Magnificação: 1.000x	Magnificação: 10.000x	Magnificação: 40.000x	

**Figura 81 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 6,0% de PMMA Sigma em DM, com diferentes magnificações.**



**Figura 82 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 8,0% de PMMA Sigma em DM, com diferentes magnificações.**

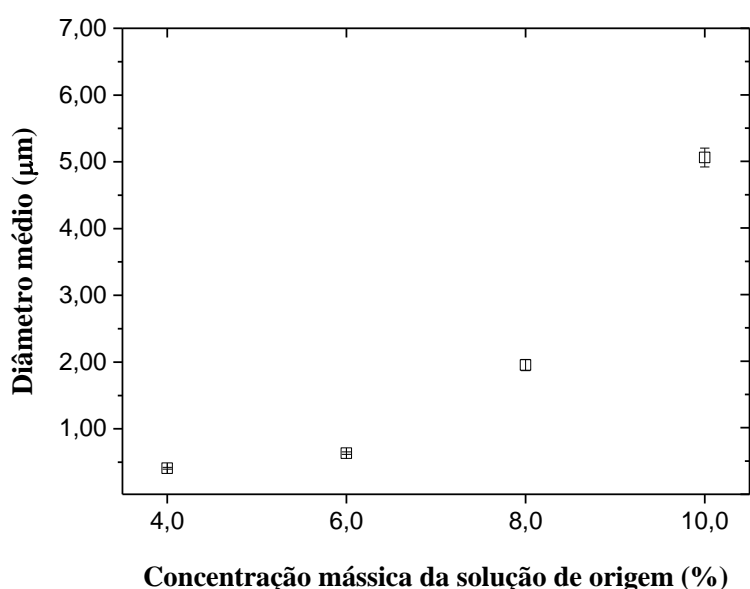


**Figura 83 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes de solução com 10,0% de PMMA Sigma em DM, com diferentes magnificações.**

É possível observar um padrão parecido com o caso anterior, com a produção de apenas esferoides com a concentração mais baixa (2,0%), e tanto esferoides quanto fios nas concentrações intermediárias (4,0% a 8,0%). Neste caso, entretanto, a solução com 10,0% de concentração não produziu fios homogêneos e contínuos. Isto acaba por sugerir que, para este conjunto polímero/solvente, concentrações ainda maiores são necessárias para dar origem a tais estruturas. Esta afirmação é justificada pelo raciocínio desenvolvido anteriormente, no tópico ‘Parâmetros influenciadores na morfologia das estruturas depositadas’. Mais uma vez a porosidade pode ser observada, mas ainda sem a mesma proeminência que no caso das estruturas de PMMA *cast*.

**Tabela 10 - Valores de diâmetro médio dos fios depositados, em função da concentração de PMMA Sigma, com DM como solvente.**

DM	4,0%	6,0%	8,0%	10,0%
Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )	0,41	0,64	1,96	5,06
Desvio padrão da média ( $\mu\text{m}$ )	0,02	0,02	0,08	0,1
Diâmetro mínimo ( $\mu\text{m}$ )	0,34	0,37	1,03	3,18
Diâmetro máximo ( $\mu\text{m}$ )	0,50	0,92	3,29	7,50
Contagem	50			



**Figura 84 - Diâmetro médio dos fios produzidos, de soluções com diferentes concentrações.**

Ao contrário do caso anterior (Clorofórmio como solvente), pode-se observar que o aumento da concentração acarreta na produção de estruturas com diâmetros cada vez maiores, como era de se esperar. A solução com 10,0%, inclusive, produziu fios com diâmetro médio de 5,06  $\mu\text{m}$ .

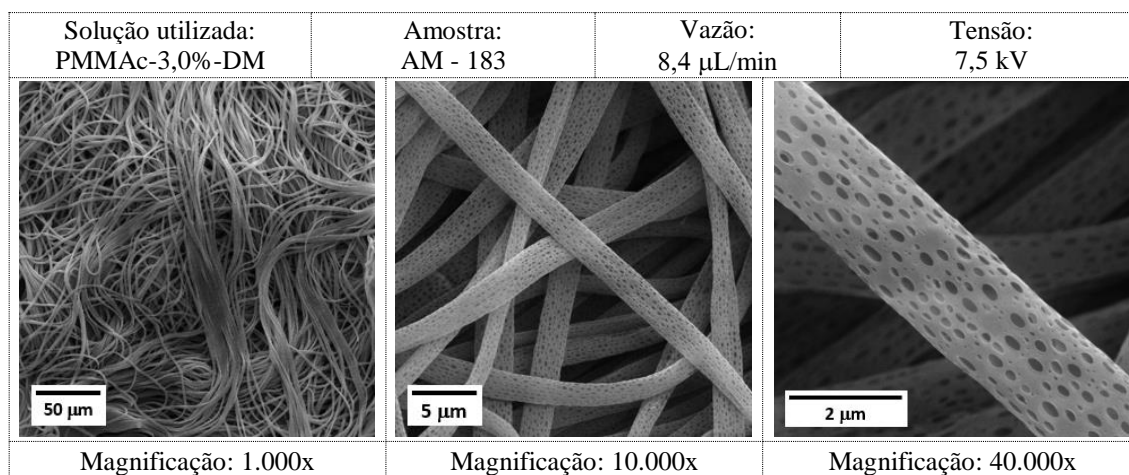
Observa-se, então, que o polímero comercial também pode ser utilizado para a produção de estruturas micrométricas. Entretanto, quando comparamos com o polímero obtido de chapas acrílicas, percebemos que a utilização do PMMA Sigma para tal finalidade se mostra menos eficiente, e muito mais cara. Além disso, o fato das estruturas produzidas com este polímero apresentarem porosidades menores, e maiores diâmetros, certamente implica em menores valores de área superficial por unidade de massa, algo indesejado neste trabalho. Assim, pode-se afirmar que a utilização deste polímero, neste caso, fica restrita à comparação morfológica



das estruturas produzidas com o PMMA *cast*. Em outras palavras, o PMMA Sigma não demonstrou viabilidade de utilização na produção de microestruturas com elevada área superficial, passíveis de aplicação em diagnósticos de enfermidades.

#### 4.2.3. PMMA *CAST* DEPOSITADO POR *EISA*

Ao analisar os resultados obtidos até aqui, decidiu-se que a solução que utiliza PMMA *cast* como soluto (na concentração mássica de 3,0%) e Diclorometano como solvente foi a que deu origem a estruturas com maior homogeneidade, produtividade e reprodutibilidade, além de grande porosidade. Assim, esta foi escolhida para ser utilizada no processo de deposição *EISA*. Graças ao maior tempo de deposição (2 horas), uma quantidade consideravelmente maior de material foi produzido.



**Figura 85 - Micrografias eletrônicas de varredura de estruturas provenientes da solução com 3,0% de PMMA *cast* em DM, depositadas pelo método *EISA*.**

É possível perceber ainda que mesmo após o processo de lavagem e secagem do material produzido, a morfologia foi preservada. Isto é vital para este trabalho, pois a alta porosidade (que leva à grande área superficial) é de extrema importância para a aplicabilidade das microestruturas. A análise do diâmetro médio dos fios produzidos pode ser observada na tabela 11:

**Tabela 11 - Valores de diâmetro médio dos fios de PMMA *cast* depositados através da técnica *EISA*.  
Concentração mássica de polímero de 3,0%, Diclorometano como solvente**

DM	3,0%
Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )	2,27
Desvio padrão da média ( $\mu\text{m}$ )	0,03
Diâmetro mínimo ( $\mu\text{m}$ )	1,43
Diâmetro máximo ( $\mu\text{m}$ )	2,55
Contagem	50

Embora o valor de diâmetro médio seja ligeiramente menor que na técnica tradicional de deposição por Eletrofiação, esta diferença não gera qualquer discrepância com os resultados obtidos anteriormente.

Assim, pode-se afirmar que a solução escolhida de fato deu origem a estruturas ideais para este trabalho. Além disso, a técnica de deposição *EISA*, bem como os processos de lavagem e secagem, mostrou-se adequada na produção de microestruturas em forma de fios homogêneos com elevada porosidade, com possibilidade de grande produção de material. Para de fato compreender a relação entre os diferentes parâmetros utilizados e a morfologia das estruturas depositadas, entretanto, a análise das medidas de reologia das soluções utilizadas é de suma importância.

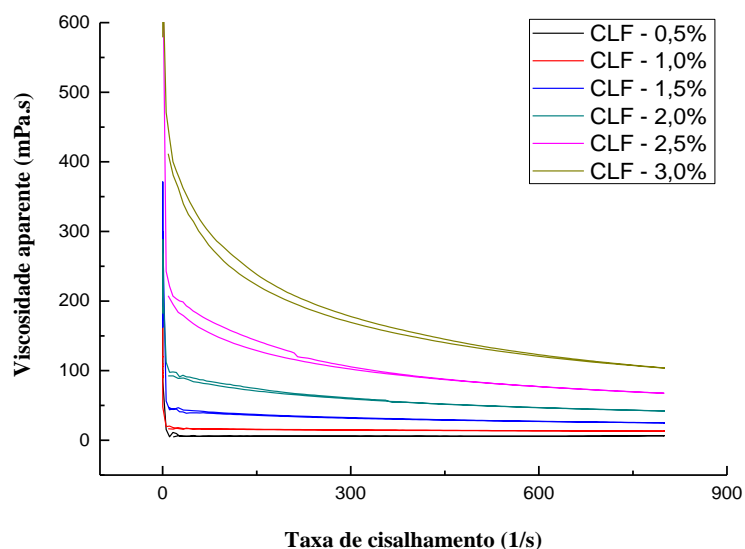
### 4.3. VISCOSIDADE DAS SOLUÇÕES

O comportamento viscosimétrico de todas as soluções utilizadas nas deposições foi caracterizado pela técnica de Reologia. Assim, foi possível retirar informações acerca da interação entre cada conjunto polímero-solvente, levando em conta as diferentes concentrações adotadas neste trabalho. Conforme será explanado neste capítulo, a compreensão desta interação permitirá um maior aprofundamento na discussão acerca da morfologia das estruturas depositadas.

Os resultados obtidos foram então separados de acordo com os diferentes polímeros e solventes utilizados.

#### 4.3.1. PMMA *CAST* COMO SOLUTO

##### Clorofórmio como solvente



**Figura 86 - Ensaio reológico de soluções de PMMA *cast*/CLF com diferentes concentrações**

A análise do gráfico da figura 86 deixa claro que soluções com maiores concentrações apresentaram maiores valores de viscosidade aparente, como era esperado. É possível perceber ainda que as soluções com concentrações mássicas de 2,0%, 2,5% e 3,0% apresentam significativa queda nos respectivos valores de viscosidade aparente, conforme um aumento na taxa de cisalhamento é observado. Esse comportamento não-linear caracteriza estas soluções como não-newtonianas, com forte caráter pseudoplástico. Esta característica, que se mostra

mais proeminente em concentrações mais altas, indica que graças à presença de grandes quantidades de polímero, as moléculas deste acabam por apresentar interações químicas mais favoráveis entre si. Ou seja, observam-se mais interações polímero-polímero do que polímero-solvente. Isto acaba por favorecer a formação de aglomerados macromoleculares, o que leva a altos valores de viscosidade. Quando maiores taxas de cisalhamento são aplicadas, mais estes aglomerados passam a se alinhar no mesmo sentido da tensão de cisalhamento aplicada, o que leva ao alongamento das moléculas destes aglomerados. A consequência direta então, do aumento na taxa de cisalhamento, é uma grande redução na viscosidade da solução analisada (ROSIC *et al.*, 2011).

Nota-se, ainda, a presença de duas curvas para cada concentração. Isto é justificado pelo tipo de teste realizado, no qual em um primeiro momento aumenta-se gradativamente a taxa de cisalhamento até um valor máximo, e em seguida é realizado o processo inverso, isto é, uma diminuição gradual desta taxa até zero. Quando as duas curvas não se sobrepõem, é dito que a solução analisada apresenta valores de viscosidade dependentes do tempo. Esta característica é observada nas soluções com 3,0%, 2,5% e 2,0% de concentração, ainda no gráfico da figura 86. Neste caso nota-se que as respectivas “curvas de retorno” apresentam valores de viscosidade menores do que as “curvas de ida”. Esta característica, denominada tixotropia, é muito comum em soluções poliméricas concentradas, e indica que parte dos aglomerados macromoleculares citados anteriormente não voltou a compactar-se após o movimento de aumento na taxa de cisalhamento.

Ao comparar as imagens de MEV das estruturas produzidas (figuras 46 a 51) com as respectivas medidas de viscosidade de cada solução de origem (figura 86), podemos perceber que apenas as soluções com forte caráter pseudoplástico deram origem a estruturas em forma de fios contínuos. Esta característica, embora já tenha sido observada em outros conjuntos polímero-solvente (ROSIC *et al.*, 2011), é inédita entre soluções utilizando PMMA como soluto. Parte da justificativa desta relação deve-se à necessidade de grande interação entre as macromoléculas do polímero para propiciar a produção de fios homogêneos. Entretanto, a correlação entre comportamento viscosimétrico das soluções utilizadas e a morfologia das estruturas produzidas ainda não está completamente elucidada. Esta característica desperta grande interesse na área, graças à possibilidade de que em um futuro próximo apenas um ensaio reológico prévio sobre o comportamento viscosimétrico das soluções produzidas possa ser o suficiente para prever a morfologia das estruturas produzidas pela técnica de Eletrofiação.

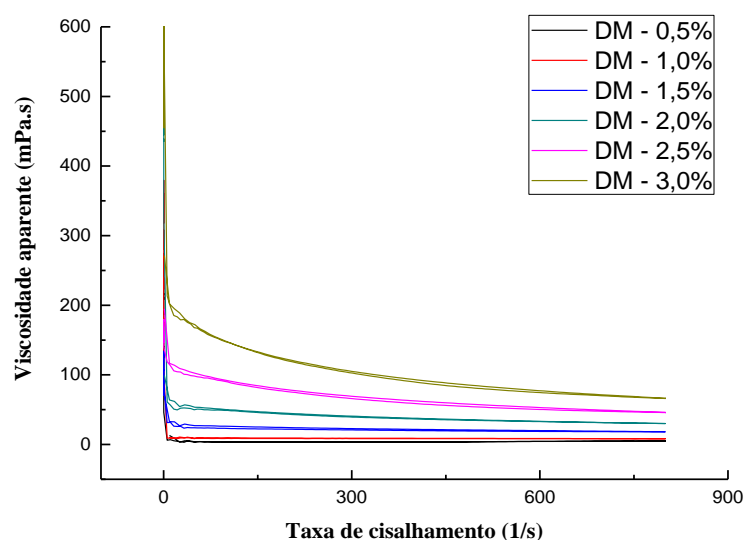
Embora boa parte das soluções aqui avaliadas apresente um comportamento pseudoplástico, todas apresentam no mínimo uma faixa de linearidade. Esta faixa de valores, usualmente observada em altas taxas de cisalhamento, é caracterizada como platô newtoniano. O valor de viscosidade aparente observado neste platô é caracterizado como a viscosidade de cada solução, exposto na tabela 12:

**Tabela 12 – Valores de viscosidade de diferentes soluções de PMMA *cast*/CLF**

PMMA <i>cast</i> /CLF	
Concentração	Viscosidade da solução
(% em massa)	(mPa.s)
0,5	6,63
1,0	13,20
1,5	25,22
2,0	42,26
2,5	67,71
3,0	104,00

Pode-se perceber então que se o caráter pseudoplástico (e a produção de fios homogêneos) só foi observado em soluções com concentração mássica igual ou superior a 2,0%, fica evidente que o valor mínimo de viscosidade para que isso ocorra, neste caso, foi de 42,26 mPa.s. Assim, já é possível notar que os valores de viscosidade aferidos pelos ensaios reológicos serão de extrema importância para a comparação do comportamento viscosimétrico entre as soluções de PMMA com diferentes solventes, bem como a correlação destes resultados com a morfologia das estruturas produzidas.

### Diclorometano como solvente



**Figura 87 - Ensaio reológico de soluções de PMMA *cast*/DM com diferentes concentrações.**

Embora um comportamento muito semelhante ao caso anterior possa ser aqui observado, isto é, soluções com maiores concentrações apresentando maiores valores de viscosidade, é possível perceber que apenas as soluções com concentrações de 2,5% e 3,0% apresentam caráter pseudoplástico. Além disso, nenhuma solução utilizando Diclorometano como solvente apresentou dependência do tempo (todas as curvas “de ida” e “de retorno” se sobrepueram). Em outras palavras, pode-se afirmar que mais uma vez nas soluções com maiores concentrações a interação polímero-polímero foi favorecida, dando origem então à aglomerados de macromoléculas de PMMA. A principal diferença, todavia, foi que após o aumento da taxa de cisalhamento (e consequente alinhamento e alongação das cadeias), estes aglomerados aparentemente voltaram a seus respectivos estados iniciais.

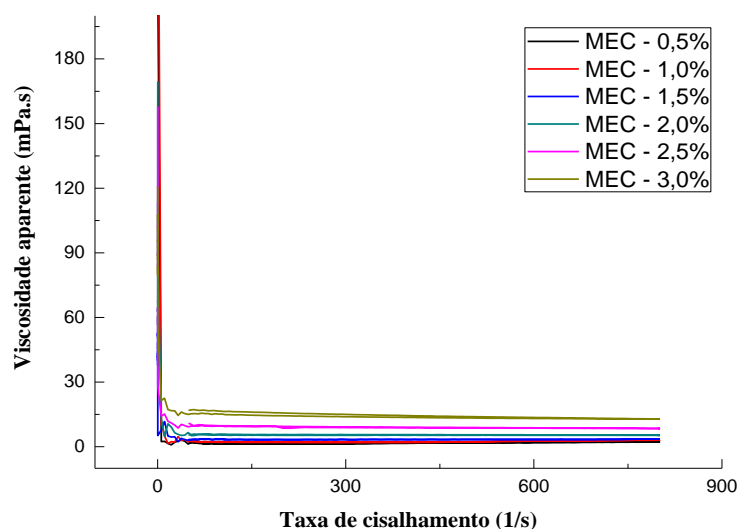
É importante ressaltar também, que mais uma vez foi possível observar a relação do caráter pseudoplástico das soluções de origem com as estruturas em forma de fios contínuos produzidas por estas. Desta maneira, também quando o Diclorometano é utilizado como solvente, nota-se que somente quando a interação polímero-polímero é grande o suficiente (a ponto de favorecer a existência de aglomerados de macromoléculas nas soluções mais concentradas), observa-se a produção de fios homogêneos e contínuos.

**Tabela 13 – Valores de viscosidade de diferentes soluções de PMMA *cast*/DM.**

PMMA <i>cast</i> /DM	
Concentração	Viscosidade da solução
(% em massa)	(mPa.s)
0,5	5,04
1,0	8,31
1,5	18,47
2,0	30,44
2,5	46,77
3,0	66,91

Comparando estas soluções com as do caso anterior (de mesmas concentrações, mas com Clorofórmio como solvente), podemos perceber menores valores de viscosidade (tabela 13), principalmente na solução com 3,0% de concentração. Isto, conforme já havia sido especulado na caracterização morfológica das estruturas produzidas, pode indicar uma melhor compatibilidade do Diclorometano com o PMMA *cast*. Ou seja, uma maior afinidade química entre as moléculas do solvente e do polímero. Assim, esta afinidade fica mais proeminente com maiores quantidades de polímero na solução. Vale lembrar, entretanto, que a interação polímero-polímero ainda se mostra mais relevante que a polímero-solvente, conforme já discutido anteriormente. Além disso, como somente as soluções com 2,5% e 3,0% apresentaram forte caráter pseudoplástico, e consequentemente a capacidade de dar origem a fios homogêneos, é correto afirmar que a viscosidade mínima para que isto ocorresse, neste caso, foi de 46,77 mPa.s.

### Metiletilcetona como solvente



**Figura 88 - Ensaio reológico de soluções de PMMA *cast*/MEC com diferentes concentrações.**

A análise do gráfico da figura 88 mostra que, diferentemente dos casos anteriores, todas as soluções de PMMA *cast* com Metiletilcetona apresentaram caráter newtoniano. Isto indica, então, que em tais soluções a interação polímero-solvente mostrou-se mais favorecida do que a polímero-polímero. Conforme pode ser observado com mais detalhes no Anexo I, isto se deve à similaridade entre as moléculas de Metiletilcetona e as de PMMA. Assim, para que as interações polímero-polímero se mostrassem mais proeminentes, maiores concentrações do polímero seriam necessárias. Este fato é evidenciado também pelos valores de viscosidade destas soluções, muito abaixo dos aferidos anteriormente. Graças a esta expressiva diferença, inclusive, foi necessário modificar a escala do eixo da ordenada para facilitar a distinção de cada curva.

Ao comparar as medidas de viscosidade com a morfologia das estruturas depositadas, é fácil perceber que nenhuma amostra apresentou fios homogêneos, conforme já discutido no capítulo anterior. Juntando este fato à ausência do caráter pseudoplástico nas soluções aqui avaliadas, mais uma vez fica comprovada a correlação entre pseudoplasticidade das soluções e a morfologia das estruturas produzidas.

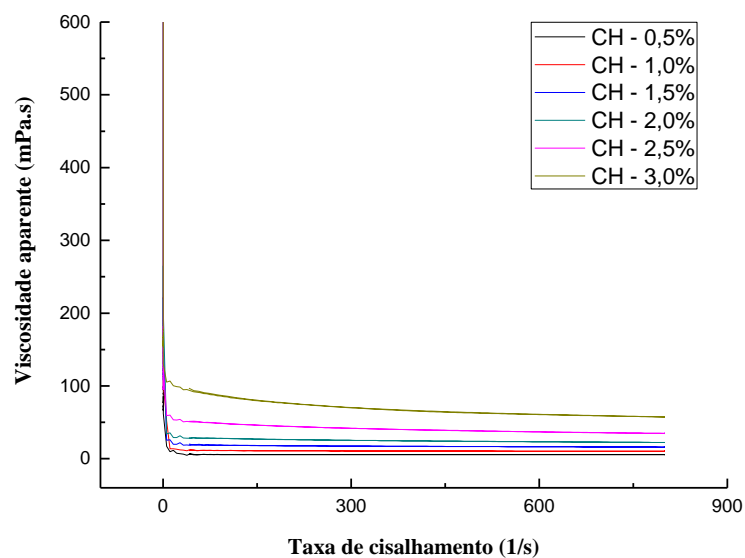


**Tabela 14 – Valores de viscosidade de diferentes soluções de PMMA *cast*/MEC.**

PMMA <i>cast</i> /MEC	
Concentração	Viscosidade da solução
(% em massa)	(mPa.s)
0,5	1,56
1,0	2,02
1,5	3,30
2,0	5,60
2,5	9,00
3,0	14,00

A análise da tabela 14 deixa claro que o maior valor de viscosidade obtido (14,00 mPa.s) é também muito inferior aos casos anteriores (Clorofórmio e Diclorometano) como solventes. É possível afirmar, inclusive, que o fato de nenhuma solução ter apresentado caráter pseudoplástico (e consequentemente não ter dado origem a nenhuma amostra com fios homogêneos) deve-se a nenhuma solução ter apresentado o valor mínimo necessário de viscosidade. Isto sugere ainda que concentrações muito maiores de PMMA *cast* seriam necessárias, neste caso, para a produção de estruturas em forma de fios homogêneos. Além de menores valores de viscosidade, pode-se perceber também uma menor diferença entre as diferentes concentrações. Em outras palavras, é seguro afirmar de maneira comparativa que o acréscimo de soluto, neste caso, acarretou em mudanças menos significativas na viscosidade das soluções.

### Ciclohexanona como solvente



**Figura 89 - Ensaio reológico de soluções de PMMA *cast*/CH com diferentes concentrações.**

As curvas de viscosidade das soluções de PMMA *cast*/Ciclohexanona, expostas na figura 89, assemelham-se mais às das soluções com Clorofórmio e Diclorometano como solventes do que às com Metiletilcetona como solvente. Como anteriormente, aqui é possível perceber mais uma vez que as soluções com 2,5% e 3,0% de concentração apresentam forte caráter pseudoplástico. As poucas estruturas em forma de fios homogêneos, inclusive, foram produzidas com estas soluções. Assim, pode-se afirmar que a correlação entre pseudoplasticidade das soluções de origem e a deposição de fios homogêneos é válida com todos os solventes. Os valores de viscosidade das soluções podem ser observados na tabela 15:

**Tabela 15 – Valores de viscosidade de diferentes soluções de PMMA *cast*/CH.**

PMMA <i>cast</i> /CH	
Concentração	Viscosidade da solução
(% em massa)	(mPa.s)
0,5	5,68
1,0	11,32
1,5	19,19
2,0	28,45
2,5	50,70
3,0	91,35

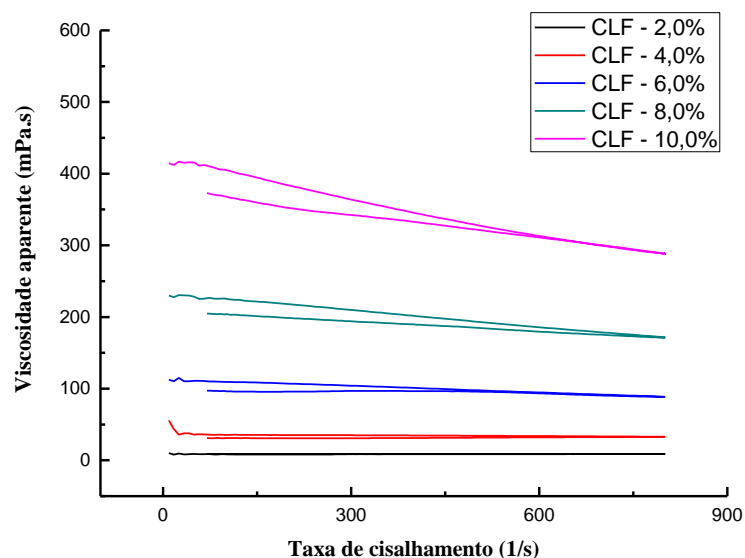
A viscosidade mínima, neste caso, necessária para a presença do caráter pseudoplástico (e consequentemente da possibilidade de produção de fios homogêneos) foi de 50,70 mPa.s, valor condizente com os casos anteriores (42,20 mPa.s e 46,77 mPa.s nas soluções com Clorofórmio e Diclorometano, respectivamente). É necessário lembrar, entretanto, que as deposições que utilizaram soluções com Ciclohexanona como solvente apresentaram eficiência muito menor que nos outros casos. Isso demonstra, então, que atingir valores mínimos de viscosidade é requisito, mas não garantia de deposição de microestruturas de PMMA em grande quantidade, e de forma eficiente.

Assim, comparando todas as medidas de reologia realizadas até aqui, podemos perceber que o valor mínimo necessário para a produção de soluções com caráter pseudoplástico foi observado foi de 42,20 mPa.s, na solução de PMMA *cast*/Clorofórmio, com concentração de 2,0%. Desta maneira, dentre os solventes utilizados, pode-se afirmar que se valores próximos a este não forem alcançados, não haverá produção de microestruturas em forma de fios homogêneos. Além disso, em todos os casos foi possível observar que este padrão de morfologia tem relação direta com o caráter pseudoplástico de suas soluções de origem.

#### 4.3.2. PMMA SIGMA COMO SOLUTO

A caracterização reológica das soluções com PMMA Sigma como soluto foi então realizada. Vale lembrar que com este polímero somente foi utilizado na produção de soluções com Clorofórmio e Diclorometano, respectivamente, devido aos resultados observados anteriormente na caracterização morfológica.

## Clorofórmio como solvente



**Figura 90 - Ensaio reológico de soluções de PMMA Sigma/CLF com diferentes concentrações.**

Mais uma vez o caráter não-newtoniano das soluções é mais evidente em concentrações maiores. Entretanto, se no caso das soluções de PMMA *cast*/CLF as soluções com concentrações mássicas iguais ou superiores a 2,0% já apresentavam esse comportamento pseudoplástico, neste caso somente as soluções em concentrações de 8,0% e 10,0% este comportamento é observado. A justificativa para tal é a mesma abordada na caracterização morfológica das estruturas produzidas: com a ausência de aditivos industriais (ou seja, maior pureza) no polímero, a interação de suas moléculas com as do solvente acaba favorecida, o que acaba por implicar no caráter newtoniano destas soluções. Esta característica, inclusive, acaba por estender a correlação entre pseudoplasticidade das soluções e morfologia das estruturas depositadas também para o sistema PMMA Sigma/Clorofórmio. Ou seja, mais uma vez somente as soluções com forte caráter pseudoplástico (8,0% e 10,0% de concentração) deram origem a fios homogêneos e contínuos.

Assim como observado nas soluções de PMMA *cast*/Clorofórmio, a análise reológica das soluções de PMMA Sigma/Clorofórmio nos informa que a viscosidade aparente também apresenta dependência do tempo. Neste caso, entretanto, com a “curva de retorno” (quando a taxa de cisalhamento está diminuindo) apresentando maiores valores em relação à “curva de ida” (quando a taxa de cisalhamento está aumentando). Em outras palavras, a viscosidade

aparente aumentou com o tempo. Esta característica, muito rara em análises reológicas, é chamada de reopexia, e a explicação para tal não é nada usual. Enquanto a maioria das soluções tende a apresentar um desagregamento molecular com o aumento da taxa de cisalhamento, soluções que apresentam caráter reopéxico tendem a apresentar um aumento nas interações entre as moléculas do soluto (PETERLIN, 1960).

É possível perceber ainda que no caso da solução de 10,0% de concentração mássica, nenhum platô newtoniano é observado. Neste caso, a viscosidade da solução foi aferida no ponto de máxima taxa de cisalhamento, sendo que esta medida só pode ser considerada válida com finalidade de comparação com as demais deste mesmo ensaio reológico.

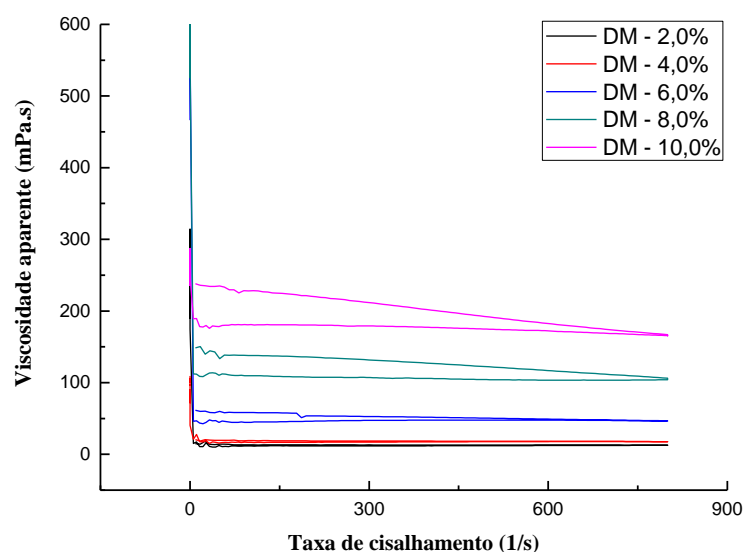
**Tabela 16 – Valores de viscosidade de diferentes soluções de PMMA Sigma/CLF.**

PMMA Sigma/CLF	
Concentração	Viscosidade da solução
(% em massa)	(mPa.s)
2,0	9,02
4,0	32,6
6,0	88,7
8,0	171,3
10,0	290,4

Mais uma vez fica claro que o aumento de soluto acarreta em significativa mudança nos valores de viscosidade. Pode-se notar, também, que a solução com 10% de concentração apresentou o maior valor de viscosidade até aqui, e deu origem a fios com o maior valor de diâmetro médio. É necessário, entretanto, lembrar que os valores de viscosidade aqui aferidos não se referem ao platô newtoniano do ensaio reológico (que, aliás, é ausente neste caso), mas sim ao menor valor observado no ponto de maior taxa de cisalhamento. Assim, qualquer comparação com as medidas anteriores deve ser feita entre as curvas de viscosimetria, e não entre os valores aferidos.

É notório, também, que embora não seja possível traçar uma clara linearidade entre a viscosidade das soluções de origem e o diâmetro médio das estruturas produzidas, a relação entre o comportamento reológico e a morfologia é de fato mais uma vez confirmada.

### Diclorometano como solvente



**Figura 91 - Ensaio reológico de soluções de PMMA Sigma/DM com diferentes concentrações.**

O mesmo comportamento reopéxico é observado nas soluções de PMMA Sigma/DM com concentrações mássicas de 6,0%, 8,0% e 10,0%. Entretanto, nenhuma das curvas (“de ida”, sempre utilizadas como referência) apresenta caráter pseudoplástico, e, ao mesmo tempo, nenhuma destas soluções produziu fios contínuos e homogêneos. A análise dos valores de viscosidade, apresentados na tabela 17, indica que assim como foi observado nas soluções com PMMA *cast* como solvente, o Diclorometano apresenta uma melhor compatibilidade com as moléculas do PMMA Sigma.

**Tabela 17 – Valores de viscosidade de diferentes soluções de PMMA Sigma/DM.**

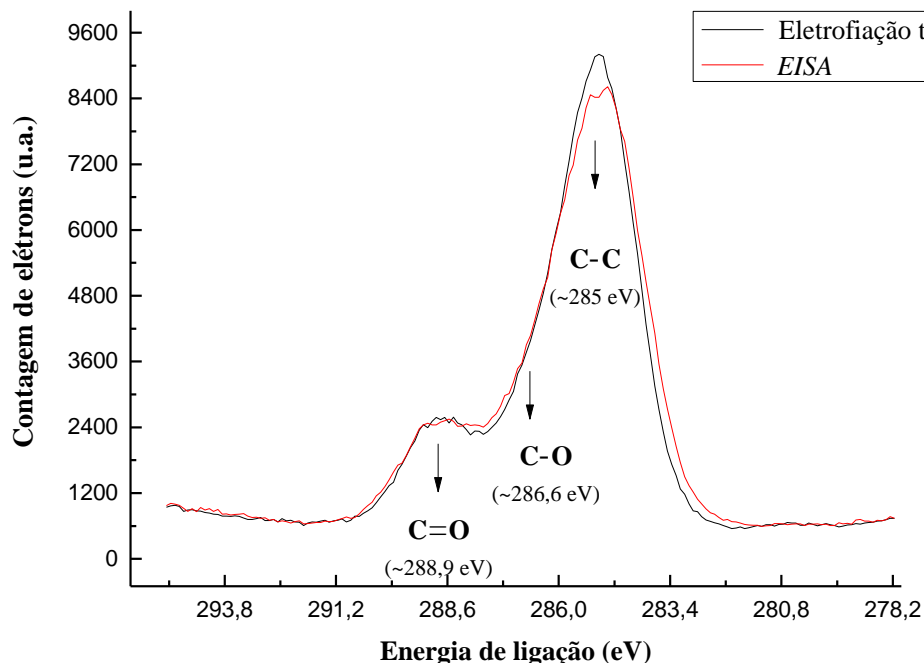
PMMA Sigma/DM	
Concentração	Viscosidade da solução
(% em massa)	(mPa.s)
2,0	13,12
4,0	17,84
6,0	46,42
8,0	103,90
10,0	165,90

Diferente do que observado nas soluções de PMMA *cast*/Clorofórmio, os valores de viscosidade demonstram que o aumento na concentração de soluto apresentou menos influência no aumento dos valores de viscosidade. Neste caso, entretanto, percebe-se que mesmo o valor de viscosidade de 165,90 mPa.s, da solução com concentração de 10%, ainda não foi suficiente para atingir o valor mínimo de viscosidade necessário para dar origem aos fios homogêneos contínuos, neste caso específico. Esta, inclusive, é a justificativa para a ausência de caráter pseudoplástico nestas soluções

Assim, temos que todas as soluções utilizadas nas deposições deste trabalho tiveram seus comportamentos viscosimétricos avaliados. Juntamente com a variação na quantidade (e no tipo) do solvente e do polímero utilizado como soluto, a viscosidade demonstrou ser um parâmetro importante a ser avaliado no processo de produção das microestruturas. Ficou claro, entretanto, que o caráter reológico (comportamento newtoniano ou pseudoplástico) demonstrou ser mais importante que a simples análise dos valores de viscosidade. Isto pode ser afirmado, pois o valor de viscosidade mínimo necessário para que houvesse a produção de fios homogêneos foi diferente para cada polímero utilizado, mas a necessidade do caráter pseudoplástico para a produção de fios homogêneos, não.

#### **4.4. ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS EXCITADOS POR RAIOS-X (XPS)**

O resultado das medidas comparativas entre as amostras depositadas através da técnica Eletrofiação e *EISA*, no espectro de ligações Cs1, pode ser observado no gráfico da figura 92:



**Figura 92 - Espectro da contagem de elétrons pelas respectivas energias de ligação do carbono s1 (Cs1), com resolução de 10 eV. Cada “pico” destacado indica a presença de ligações químicas específicas.**

É possível perceber que em ambas as amostras foram identificadas as seguintes ligações:

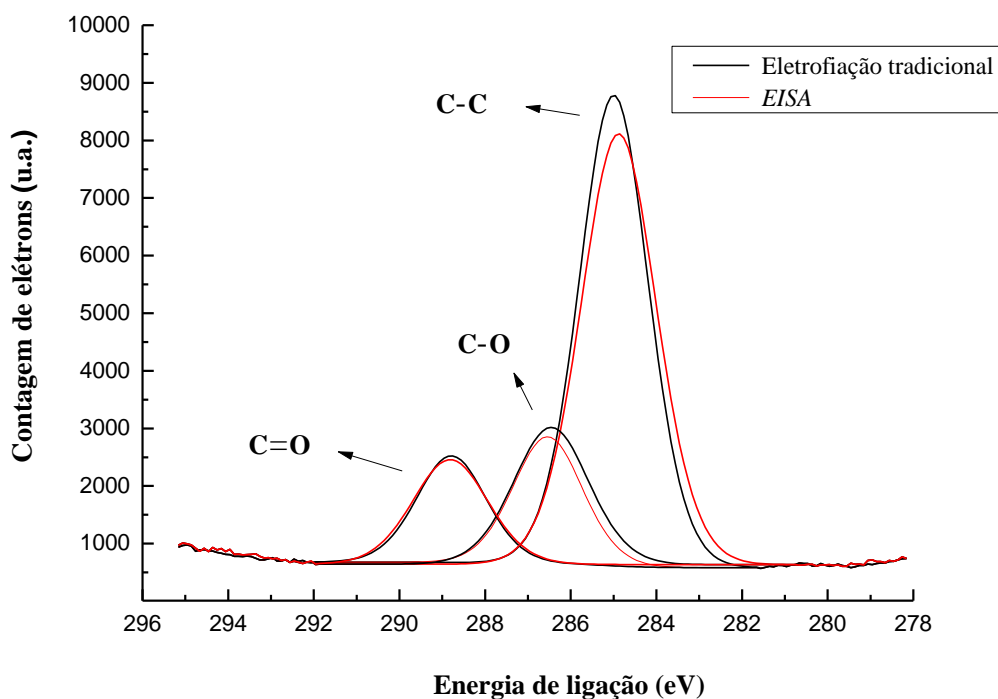
- Ligações simples entre átomos de carbono (C-C)
- Ligações simples entre átomos de carbono e oxigênio (C-O)
- Ligações duplas entre átomos de carbono e oxigênio (C=O)

Ao analisar a estrutura das moléculas de PMMA (figura 1), percebe-se que a presença destas ligações já era esperada. Nota-se, entretanto, que, com exceção do pico C-C, nenhuma diferença expressiva de contagem eletrônica pode ser observada entre a amostra de PMMA depositado por Eletrofiliação (não funcionalizado) e a depositada pela técnica EISA (funcionalizado). Ou seja, o gráfico da figura 92 só acaba por informar que menos ligações C-C estão presentes nas amostras funcionalizadas, quando comparadas com as estruturas não funcionalizadas.

Como as diferentes energias características de ligações Cs1 apresentam valores muito próximos, observa-se um efeito de sobreposição entre os diferentes picos. Assim, para realizar a análise da proporção de cada ligação presente na amostra, é necessário realizar a



deconvolução das curvas do gráfico da figura 92, a fim de se obter as curvas correspondentes a cada ligação química, separadamente.



**Figura 93 - Espectro da contagem de elétrons pelas respectivas energias de ligação do carbono s1 (Cs1), com resolução de 10 eV, após deconvolução. Cada “pico” destacado indica a presença de ligações químicas específicas.**

A análise da área correspondente a cada pico, por sua vez, informa a quantidade percentual de cada ligação presente na amostra, exposta na tabela 18:

**Tabela 18 - Áreas do gráfico 14 correspondentes ao número (e tipos) de ligações químicas presentes no polímero.**

	Área percentual		
	C-C	C-O	C=O
PMMA (Eletrofiação)	(68,7 ± 0,1) %	(16,2 ± 0,1) %	(15,1 ± 0,1) %
PMMA (EISA)	(63,3 ± 0,1) %	(21,3 ± 0,1) %	(15,4 ± 0,1) %
Diferença no número de ligações	(- 5,4 ± 0,2) %	(+ 5,1 ± 0,2) %	(+ 0,3 ± 0,2) %

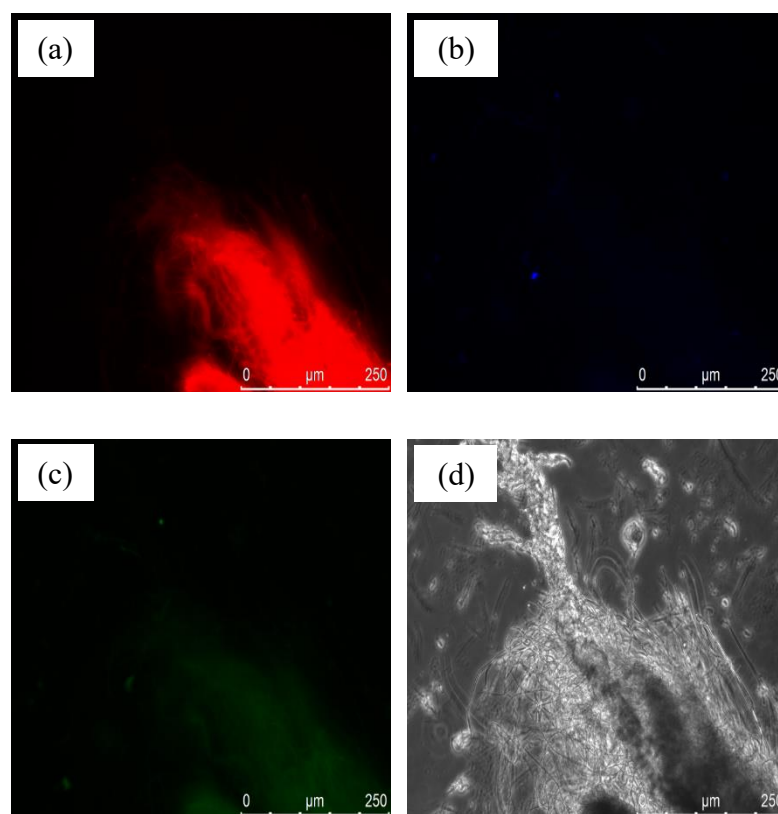
Percebe-se então que, como era de se esperar, a amostra depositada por Eletrofiação (não funcionalizada), apresenta a maior parte de suas ligações como sendo C-C (68,7%), seguido de ligações C-O (16,2%) e C=O (15,1%). Já a amostra depositada por *EISA* apresenta 5,4% menos ligações C-C, entretanto 5,1% mais ligações C-O e 0,3% mais ligações C=O. Ou seja, estes dados sugerem que o processo de deposição *EISA* proporciona a quebra de ligações C-C e favorece, principalmente, o surgimento de novas ligações C-O. Em outras palavras, este processo de fato permite a modificação química superficial do polímero depositado.

É importante, todavia, estar ciente que a técnica *XPS*, por apenas identificar ligações envolvendo átomos de carbono, não pode de fato identificar qual o grupo funcional está sendo de fato acoplado à cadeia polimérica original. Assim, com base nos resultados até aqui obtidos, pode-se especular que terminais hidroxila (-OH) estão sendo acoplados. Não se pode, entretanto, descartar a possibilidade destas hidroxilas estarem sendo acopladas às carbonilas (-CO), dando então origem a grupos carboxila (-COOH), que apresentam funcionalidades muitas vezes diferentes das hidroxilas. Assim, percebe-se que a técnica *XPS*, por si só, não é suficiente para a completa identificação/caracterização específica da funcionalização proporcionada pelo processo de deposição *EISA*. Com isso em mente, decidiu-se utilizar um ensaio químico na tentativa de realizar esta identificação.

#### 4.4 ENSAIOS DE IDENTIFICAÇÃO/CONFIRMAÇÃO DO GRUPO FUNCIONAL

Conforme já abordado em ‘Materiais e métodos’, o ensaio de identificação/confirmação do grupo funcional baseia-se no princípio da tentativa de bloqueio da atividade de tal grupo. Dependendo do “agente bloqueador” que agir com sucesso, é possível identificar qual terminal ativo foi acoplado às cadeias poliméricas originais.

Primeiramente foi realizada a tentativa de bloqueio do grupo funcional com o composto Tris-HCl. A figura 94 apresenta as análises de fluorescência obtidas pelo microscópio óptico de deconvolução:

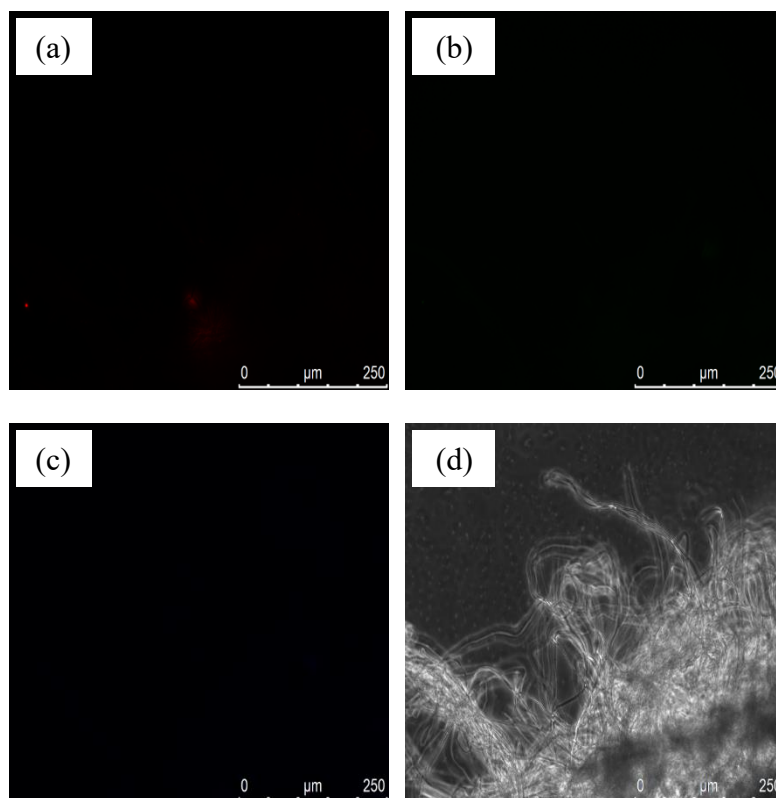


**Figura 94 – Imagens de análise de fluorescência em microscópio óptico de deconvolução, nas cores vermelha (a), azul (b), verde (c) e *merge* com contraste de fase (d).**

Embora um reduzido processo de fluorescência possa ser observado nas cores azul e verde, assim como na sobreposição com contraste de fase (*merge*), na cor vermelha tem-se um intenso processo de fluorescência, característica típica da molécula marcadora utilizada (Ficoeritrina). Relembrando o raciocínio apresentado e resumido na figura 38, percebe-se que a permanência

da luminescência após a utilização do Tris-HCl indica que o grupo funcional acoplado às cadeias poliméricas originais não é, de fato, a carboxila.

Dando seguimento à metodologia utilizada, a análise da fluorescência realizada após a tentativa de bloqueio com o *BSA*, para avaliar a presença de terminais hidroxila acoplados às cadeias poliméricas originais, apresentou os seguintes resultados:



**Figura 95 - Imagens de análise de fluorescência em microscópio óptico de deconvolução, nas cores vermelha (a), azul (b), verde (c) e *merge* com contraste de fase (d).**

Ao analisar a figura 95 é não é possível perceber nenhum processo significativo de fluorescência, em nenhuma das cores analisadas (nem na sobreposição delas, com contraste de fase). Logo, de acordo com o raciocínio anteriormente desenvolvido, pode-se afirmar que o *BSA* de fato foi capaz de bloquear a atividade do terminal funcional. Assim, como já sabemos (através das medidas obtidas por *XPS*) que o terminal funcionalizado acopla-se à cadeia original através de uma ligação simples entre átomos de carbono e oxigênio (C-O), e carboxilas (-COOH) não estão envolvidas neste processo, podemos finalmente afirmar que o grupo funcional incorporado é, de fato, a hidroxila (-OH).

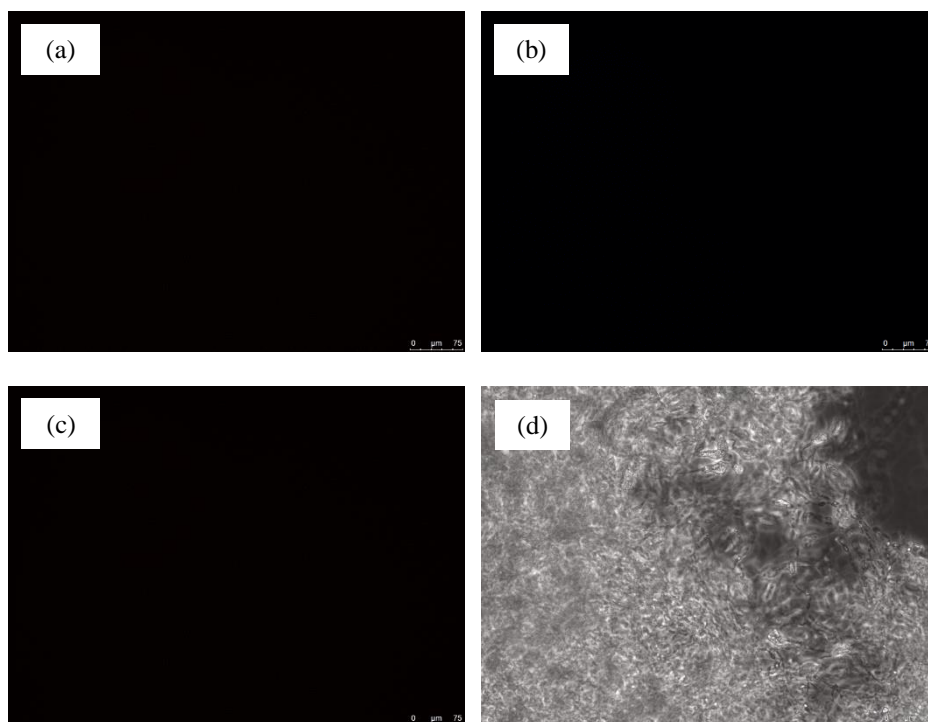
A identificação deste terminal, inclusive, nos informa ainda que a carbonila (-CO-) originalmente presente no PMMA não está sendo quebrada durante o processo de funcionalização. Assim, como de fato ligações carbônicas foram quebradas durante este processo, as diferentes medidas realizadas nos informam que grupos metila (-CH<sub>3</sub>) e/ou metileno (-CH<sub>2</sub>-) estão sendo quebrados/desligados da cadeia carbônica original. Descobrir em qual ponto específico da cadeia isto acontece, até o presente momento, ainda é um desafio. Medidas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), normalmente utilizadas para identificar a posição de moléculas específicas em cadeias carbônicas, não foram capazes de realizar esta identificação neste trabalho. A justificativa para esta dificuldade é que como o método de funcionalização utilizado permite apenas a modificação química superficial do material, o *bulk* do polímero permanece intacto. Assim, a razão ‘funcionalização por volume de material’ aparenta ser muito reduzida para ser detectada pelas técnicas convencionais. Desta maneira, a identificação da posição específica na cadeia polimérica onde os grupos hidroxila estão sendo acoplados, até o momento, permanece uma questão em aberto.

#### **4.5. ENSAIOS DE DETECÇÃO DE ANTICORPOS DE HIV**

A fim de avaliar uma possível aplicação das microestruturas de PMMA funcionalizadas, ensaios de detecção de anticorpos de HIV, através do método *ELISA*, foram realizados no IBMP. Para avaliar se a presença do terminal funcionalizado (hidroxila) é de fato essencial no processo de detecção, os ensaios biológicos foram realizados tanto com as amostras produzidas por Eletrofiação (não funcionalizadas) quanto as produzidas pela técnica *EISA*.

##### **4.5.1. AMOSTRAS DEPOSITADAS POR ELETROFIAÇÃO TRADICIONAL**

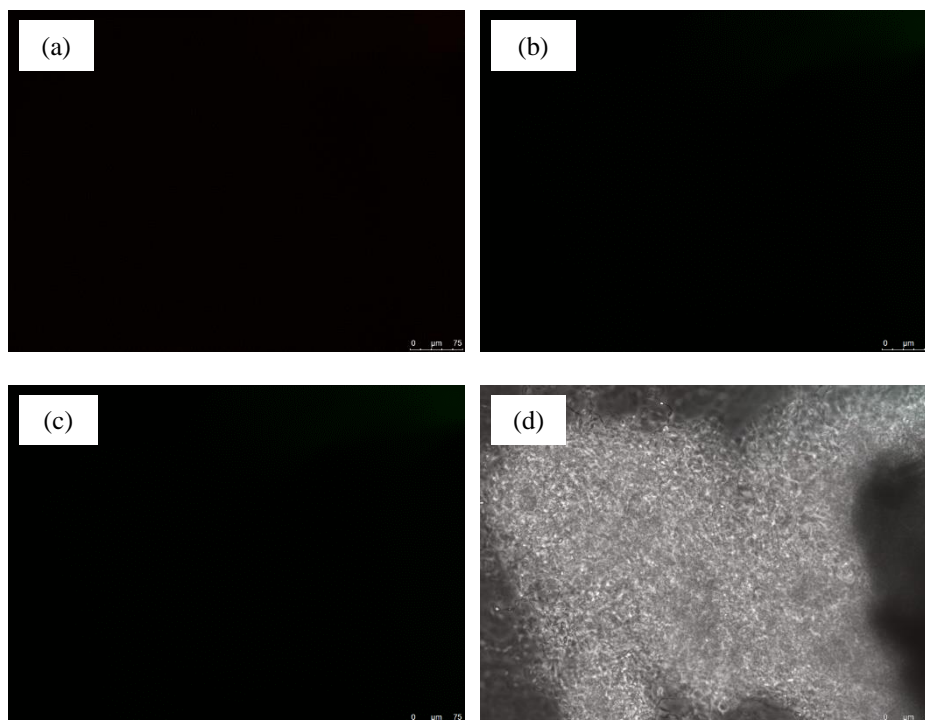
Seguindo a metodologia previamente abordada, foram realizados testes de detecção de anticorpos de HIV, primeiramente utilizando amostras depositadas pelo método tradicional de Eletrofiação. A fim de comparação, todavia, o primeiro ensaio foi realizado justamente sem a presença de anticorpos de HIV, o que simula um teste negativo para a doença. Os resultados da análise de fluorescência estão expostos na figura 96:



**Figura 96 - Imagens de análise de fluorescência em microscópio óptico de deconvolução, nas cores vermelha (a), azul (b), verde (c), e *merge* com contraste de fase (d). Amostras produzidas por Eletrofiação, em teste negativo para HIV.**

Fica claro que nenhum processo significativo de fluorescência pode ser observado, em nenhuma das cores avaliadas, nem na sobreposição delas com contraste de fase (*merge*). Isto indica então, como já era esperado, que a molécula marcadora fluorescente não se acoplou às cadeias poliméricas, devido à ausência tanto das hidroxilas quanto dos anticorpos de HIV.

Em seguida, ainda utilizando amostras não funcionalizadas, foi realizado o mesmo teste anterior, mas desta vez com a presença de anticorpos, o que simula então um teste positivo para HIV. Os resultados das análises de fluorescência podem ser observados na figura 97:



**Figura 97 - Imagens de análise de fluorescência em microscópio óptico de deconvolução, nas cores vermelha (a), azul (b), verde (c) e *merge* com contraste de fase (d). Amostras produzidas por Eletrofiação, em teste positivo para HIV.**

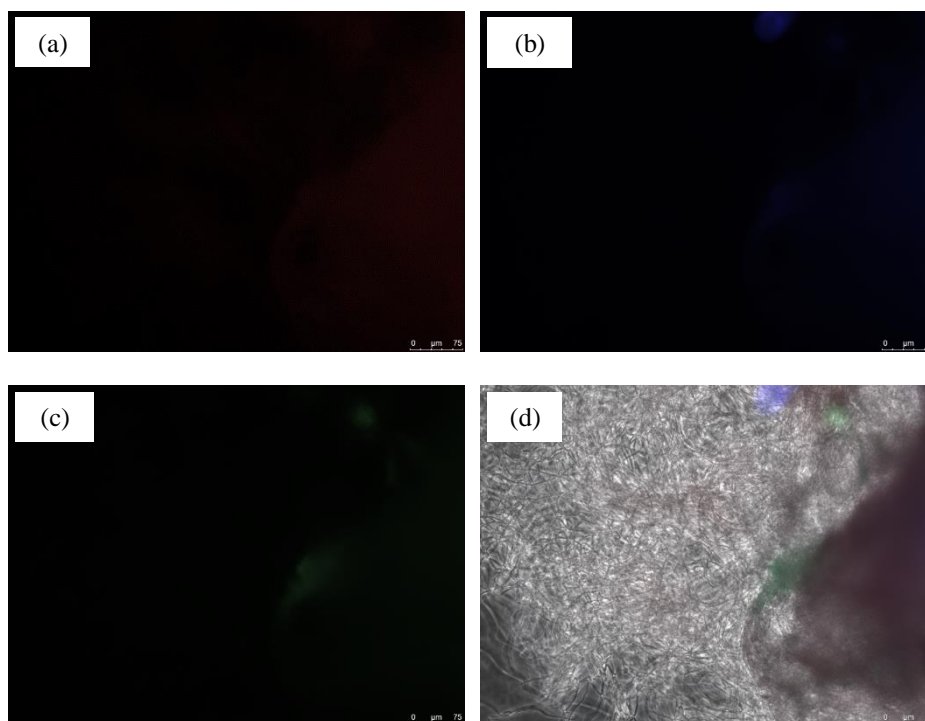
Mais uma vez nenhum processo de fluorescência pôde ser percebido. Isso indica então, como também já era esperado, que mesmo com a presença dos antígenos de HIV as moléculas marcadoras fluorescentes acabaram por não realizar o acoplamento às cadeias poliméricas. O motivo, novamente, foi a ausência de grupos hidroxila, já que as amostras utilizadas propositalmente não foram funcionalizadas.

Com isso, fica demonstrado que as microestruturas de PMMA produzidas por Eletrofiação (tradicional, sem funcionalização) não podem ser utilizadas na detecção de antígenos de HIV através do método *ELISA*. Em outras palavras, a presença de grupos hidroxila acoplados às cadeias de PMMA mostrou-se essencial na realização desta tarefa.

#### 4.5.2. AMOSTRAS DEPOSITADAS POR ELETROFIAÇÃO FUNCIONALIZANTE (*EISA*)

Para avaliar então a possibilidade de utilização das amostras de PMMA depositadas por *EISA* (funcionalizadas com grupos hidroxilas), na detecção de anticorpos de HIV através do método *ELISA*, repetiu-se a metodologia utilizada anteriormente. Assim, novamente a fim de

comparação, o primeiro ensaio foi realizado justamente sem a presença de anticorpos, o que simula um teste negativo para HIV. Os resultados da análise de fluorescência estão expostos na figura 98:

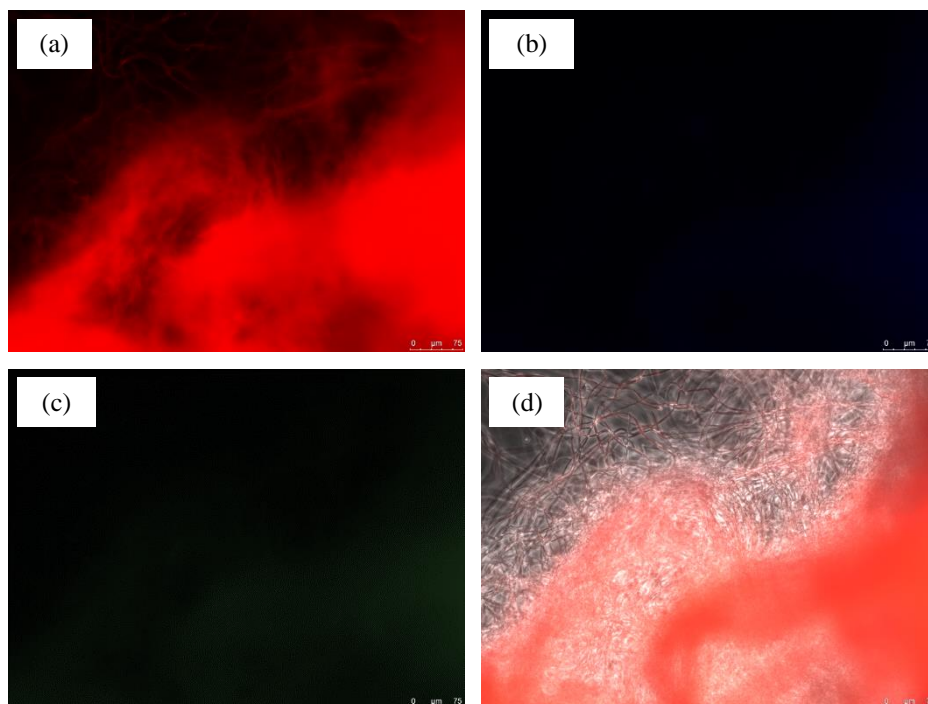


**Figura 98 - Imagens de análise de fluorescência em microscópio óptico de deconvolução, nas cores vermelha (a), azul (b), verde (c) e *merge* com contraste de fase (d). Amostras produzidas por *EISA*, em teste negativo para HIV.**

Como já era esperado, a ausência de anticorpos de HIV impediu o acoplamento das moléculas marcadoras fluorescentes às cadeias poliméricas. Isso ocorreu, pois mesmo com a presença do grupo funcional, os anticorpos são necessários para a detecção do processo de fluorescência ao final do ensaio. Ou seja, assim como desejado, a ausência de fluorescência nas imagens da figura 98 demonstra o resultado de um teste negativo para HIV.

No próximo passo, então, foi realizado o mesmo teste anterior, mas desta vez com a presença de anticorpos, o que simula então um teste positivo para HIV. Os resultados das análises de fluorescência podem ser observados na figura 99:





**Figura 99 - Imagens de análise de fluorescência em microscópio óptico de deconvolução, nas cores vermelha (a), azul (b), verde (c) e *merge* com contraste de fase (d). Amostras produzidas por *EISA*, em teste positivo para HIV.**

Um forte processo de fluorescência pode ser observado, principalmente na cor vermelha e no *merge*. Ou seja, o material aqui utilizado mostrou-se apto a “capturar” os anticorpos de HIV, que por sua vez permitiram o acoplamento das moléculas marcadoras fluorescentes. Comparando estes resultados com os testes negativos para HIV, pode-se afirmar que as microestruturas de PMMA funcionalizadas mostraram-se aptas para agirem como substratos para detecção de antígenos de HIV, com clara distinção entre os testes positivos e negativos para a doença.

É preciso ressaltar, então, que os resultados aqui apresentados demonstram um grande potencial de aplicação das microestruturas funcionalizadas na detecção de enfermidades. Entretanto, é necessário deixar claro que os resultados obtidos servem como uma consistente prova de conceito acerca da aplicabilidade do material, e não como evidência final da utilização das microestruturas em diagnósticos de saúde pública, por exemplo. Para isso, estudos de viabilidade e demanda (entre outros) se fazem necessário. A reprodutibilidade e confiabilidade das medidas, contudo, sugerem que tanto a técnica *EISA* quanto o PMMA *cast* possam ser utilizadas na produção de diversos sensores químicos e biológicos, a serem desenvolvidos em trabalhos posteriores.

## 5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi demonstrada a possibilidade de deposição de fios de PMMA com diâmetros nano/micrométricos com diferentes porosidades e áreas superficiais. Para tal, as soluções contendo Clorofórmio ou Diclorometano como solventes apresentaram os melhores resultados. Foi possível perceber ainda que apenas soluções com forte caráter pseudoplástico deram origem a fios contínuos e homogêneos, com total ausência de esferoides. Para que este caráter seja observado, entretanto, valores mínimos de viscosidade devem ser atingidos, que variam conforme o polímero utilizado como soluto.

Foi demonstrada, também, a utilização da técnica *EISA* para produção de microestruturas de PMMA superficialmente funcionalizadas. A análise química de *XPS* mostrou uma taxa de funcionalização superficial aproximada de 5,1%. Ensaios biológicos corroboraram a hipótese de presença de grupos funcionais hidroxila imobilizados na superfície do polímero. Além disso, estes materiais foram utilizados com sucesso na detecção de amostras sanguíneas contaminadas com anticorpos de HIV, através do método *ELISA*. Assim, a utilização das estruturas depositadas como substratos de detecção de doenças é extremamente promissora, em função da simplicidade e reduzido custo do processo.

## 6. ANEXO I

Neste capítulo são apresentados os solventes utilizados, citando algumas de suas características e propriedades, além da justificativa para a utilização de cada um destes no trabalho.

### 6.1. CLOROFÓRMIO

Também conhecido como Triclorometano, o Clorofórmio é um composto orgânico do grupo dos trialometanos, de fórmula química  $\text{CHCl}_3$ , com estrutura química apresentada na figura 100:

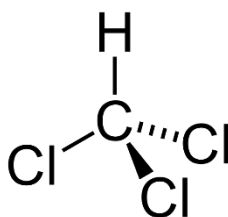


Figura 100 - Estrutura química do Clorofórmio

É muito utilizado como solvente industrial, justamente por apresentar boa afinidade química com muitas resinas industriais, dentre eles os acrilatos de forma geral. O clorofórmio apresenta, dentre os solventes utilizados neste trabalho, os maiores valores de massa molar e densidade, ambos apresentados na tabela 19.

Tabela 19 - Propriedades/características do clorofórmio

Massa molar	119,37 g/mol
Densidade (a 20 °C)	1,49 g/cm <sup>3</sup>
Ponto de fusão	- 63,5 °C
Ponto de ebulição	61,15 °C
Pressão de vapor (a 20 °C)	25,9 kPa
Momento dipolar	1,15 D

A baixa temperatura de ebulição acaba ainda por exercer forte influência na volatilidade, e consequentemente, no alto valor de pressão de vapor deste solvente. Esta propriedade garante a este composto orgânico uma alta taxa de evaporação à temperatura ambiente, e

consequentemente, permite a deposição de estruturas poliméricas com alta porosidade. Essa característica, além da capacidade de solubilização do PMMA, justifica a presença do Clorofórmio neste trabalho.

## 6.2. DICLOROMETANO

O Diclorometano é um solvente orgânico de fórmula química  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Este composto é um hidrocarboneto clorado, ou seja, além de átomos de carbono e hidrogênio, tem ainda a presença de cloro em sua estrutura, conforme pode ser observado na figura 101.

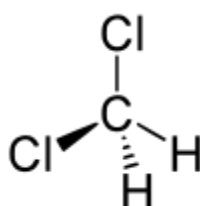


Figura 101 - Estrutura química do Diclorometano

Com estrutura muito semelhante com a do Clorofórmio, o Diclorometano também é conhecido como Cloreto de Metileno, e é principalmente utilizado como solvente industrial, justamente pela capacidade de solubilização de inúmeras resinas industriais. Uma de suas características mais proeminentes é a altíssima volatilidade, decorrente do alto valor de pressão de vapor, exposto na tabela 20:

Tabela 20 - Propriedades/características do Diclorometano

Massa molar	84,93 g/mol
Densidade (a 20 °C)	1,33 g/cm <sup>3</sup>
Ponto de fusão	- 96,7 °C
Ponto de ebulição	39,75 °C
Pressão de vapor (a 20 °C)	47 kPa
Momento dipolar	1,6 D

É possível perceber ainda que este solvente apresenta menores valores de massa molar e densidade, quando comparado ao Clorofórmio. Isto é creditado à ausência de um átomo de cloro neste composto, em relação ao anterior. Em contrapartida, o valor de momento dipolar é relevantemente superior. A pressão de vapor ainda mais alta que a do Clorofórmio, e a

capacidade de solubilização do PMMA foram as características que fizeram este composto ser escolhido como um dos solventes deste trabalho, justamente para possibilitar a produção de estruturas com porosidades ainda maiores.

### 6.3. METILETILCETONA

Também conhecida como Butanona, a Metiletilcetona é um composto químico de forma  $C_4H_8O$ . Diferentes dos solventes previamente citados, pertence ao grupo das cetonas, isto é, apresenta um grupo carbonila ligado a dois radicais orgânicos, como pode ser observado na figura 102.

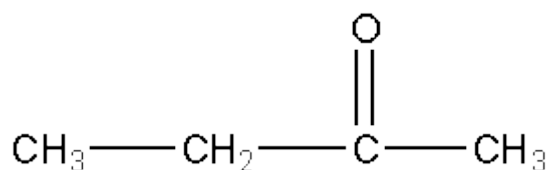


Figura 102 - Estrutura química da Metiletilcetona

A presença de um grupo carbonila acaba por ser decisiva na capacidade de solubilização completa do PMMA (que também apresenta este grupo químico em sua composição). A carbonila, inclusive, é a principal responsável pelo alto valor de momento dipolar deste solvente. Comparada com o Clorofórmio e o Diclorometano, entretanto, a Metiletilcetona apresenta valor de pressão de vapor consideravelmente inferior, conforme pode ser observado na tabela 21:

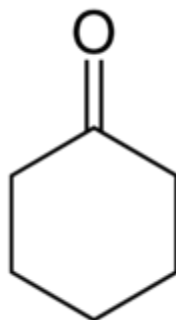
Tabela 21 - Propriedades/características da Metiletilcetona

Massa molar	72,11 g/mol
Densidade (a 20 °C)	0,80 g/cm <sup>3</sup>
Ponto de fusão	- 86,12 °C
Ponto de ebulição	79,64 °C
Pressão de vapor (a 20 °C)	10,4 kPa
Momento dipolar	2,76 D

Esta característica garantiu a escolha deste solvente neste trabalho, pois de acordo com a literatura, isto permite a produção de estruturas com porosidade consideravelmente menor que a dos casos anteriormente citados.

#### 6.4. CICLOHEXANONA

A Ciclohexanona é um composto orgânico que apresenta uma molécula cíclica de seis carbonos, contendo um grupo cetona.



**Figura 103 – Estrutura química da Ciclohexanona**

Diferentemente dos solventes anteriormente apresentados, não apresenta átomos de hidrogênio em sua composição. Embora isto acabe por atrasar a dissolução das moléculas de PMMA, não impede a ocorrência deste processo, tendo em vista que a carbonila presente em sua estrutura acaba por garantir a solubilidade do polímero neste solvente. A Ciclohexanona foi escolhida graças ao baixíssimo valor de pressão de vapor (660 Pa), justamente para avaliar a possibilidade de produção de estruturas com ausência total de porosidade.

**Tabela 22 - Propriedades/características do Ciclohexanona**

Massa molar	98,15 g/mol
Densidade (a 20 °C)	0,95 g/cm <sup>3</sup>
Ponto de fusão	- 16,4 °C
Ponto de ebulição	155,65 °C
Pressão de vapor (a 20 °C)	660 Pa
Momento dipolar	3,06 D

Com valores de massa molar e densidade maiores que da Metiletilcetona, este solvente acaba por ser, dentre os escolhidos para este trabalho, o que apresenta menor semelhança

estrutural com as moléculas de PMMA. Embora esta característica não seja desejável, a Ciclohexanona foi escolhida para ser utilizada neste trabalho por ser um dos poucos solventes orgânicos capazes de solubilizar este polímero que apresenta valores de pressão de vapor abaixo de 1 kPa, e que pode ser manuseado com segurança e praticidade.

## 7. REFERÊNCIAS

- ANTON, F.; **Method and Apparatus for Spinning**. U.S. Patent n. 2.160.962. 6 Jun, 1939.
- ANTON, F.; **Process and Apparatus for Preparing Artificial Threads**. U.S. Patent n. 1.975.504, 2 Out, 1934.
- BAUMGARTEN, P. K.; *Electrostatic spinning of acrylic microfibers*. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 36, n. 1, p. 71-79, 1971.
- CALLISTER, W.D.; **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução**. 8ª Edição. Editora LTC, 2008.
- CARVALHO, N. B. *et al.*; *Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases*. **Quim. Nova**, v. 38, n. 3, p. 399-409, 2014.
- COOLEY, J. F. Improved methods of and apparatus for electrically separating the relatively volatile liquid component from the component of relatively fixed substances of composite fluids. **United Kingdom Patent**, v. 6385, 1900.
- COOLEY, John F. **Apparatus for Electrically Dispersing Fluids**. U.S. Patent n. 692.631, 4 Fev. 1902.
- DAYAL, P. *et al.*; *Experimental and theoretical investigations of porous structure formation in electrospun fibers*. **Macromolecules**, v. 40, n. 21, p. 7689-7694, 2007.
- DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G.; **Microscopia Eletrônica de Varredura: Aplicações e Preparação de Amostras**. 1ª Edição. EDIPUCRS, 2007.
- DONG, Hong *et al.* *Assembly of metal nanoparticles on electrospun nylon 6 nanofibers by control of interfacial hydrogen-bonding interactions*. **Chemistry of Materials**, v. 20, n. 21, p. 6627-6632, 2008.
- FOTI, Leonardo *et al.* *Electrospray induced surface activation of polystyrene microbeads for diagnostic applications*. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 13, p. 2725-2731, 2015.
- GIBSON, P. *et al.*; *Transport properties of porous membranes based on electrospun nanofibers*. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 187, p. 469-481, 2001.



GOUMA, P. I.; *Nanostructured polymorphic oxides for advanced chemosensors*. **Rev. Adv. Mater. Sci**, v. 5, n. 123, p. 122, 2003.

HORN, M.B.; **Acrylic Resins**. Chapman & Hall, 1960.

KLANK, H.; KUTTER, J. P.; GESCHKE, O. *CO<sub>2</sub>-laser micromachining and back-end processing for rapid production of PMMA-based microfluidic systems*. **Lab on a Chip**, v. 2, n. 4, p. 242-246, 2002.

LI, LU *et al.* *Hierarchically structured PMMA fibers fabricated by electrospinning*. **RSC Advances**, v. 4, n. 95, p. 52973-52985, 2014.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C.; **Caracterização de Polímeros**. 1<sup>a</sup> Edição. E-papers Serviços Editoriais, 2001.

LUONG, N. D. *et al.* *Surface modification of poly (l-lactide) electrospun fibers with nanocrystal hydroxyapatite for engineered scaffold applications*. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 8, p. 1242-1249, 2008.

MARK, J. E. **Physical Properties of Polymers Handbook**. New York: AIP Press, 1996.

MEGELSKI, Silke *et al.*; *Micro-and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers*. **Macromolecules**, v. 35, n. 22, p. 8456-8466, 2002.

MORTON, W. J.; **Method of Dispersing Fluids**. U.S. Patent n. 705,691, 29 Jul, 1902.

PARK, K.; JU, Y. M.; SON J. S.; AHN, K. D.; HAN, D. K.; *Surface modification of biodegradable electrospun nanofiber scaffolds and their interaction with fibroblasts*. **J. Biomater. Sci., Polym.** p. 369-382. 18<sup>a</sup> Edição, 2007.

PETERLIN, A. *Gradient dependence of intrinsic viscosity of freely flexible linear macromolecules*. **The Journal of Chemical Physics**, v. 33, n. 6, p. 1799-1802, 1960.

RAHAL, F. A.; SAUL, C. K. *Symmetrical Ball Check-Valve Based Rotation-Sensitive Pump*. **Journal of Fluids Engineering**, v. 135, n. 11, p. 101, 2013.

RAMAKRISHNA, S. *et al.*; *Electrospun nanofibers: solving global issues*. **Materials Today**, v. 9, n. 3, p. 40-50, 2006.

RHO, J. Y.; ASHMAN, R. B.; TURNER, C. H. *Young's modulus of trabecular and cortical bone material: ultrasonic and microtensile measurements*. **Journal of Biomechanics**, v. 26, n. 2, p. 111-119, 1993.

ROŠIĆ, R. *et al.* *The role of rheology of polymer solutions in predicting nanofiber formation by electrospinning.* **European Polymer Journal**, v. 48, n. 8, p. 1374-1384, 2012.

SWALIN, R. A.; **Thermodynamics of Solids.** 4<sup>a</sup> Edição. Wiley, 1967

TAYLOR, G.; *Disintegration of water drops in an electric field.* **Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences.** The Royal Society, p. 383-397, 1964.

WANG, H. *et al.*; *Electrospun poly (methyl methacrylate) nanofibers and microparticles.* **Journal of Materials Science**, v. 45, n. 4, p. 1032-1038, 2009.

WEI, S. *et al.* *Nanoporous poly (methyl methacrylate)-quantum dots nanocomposite fibers toward biomedical applications.* **Polymer**, v. 52, n. 25, p. 5817-5829, 2011.

YANG, D. *et al.*; *Electrospinning of poly (dimethylsiloxane)/poly (methyl methacrylate) nanofibrous membrane: Fabrication and application in protein microarrays.* **Biomacromolecules**, v. 10, n. 12, p. 3335-3340, 2009.

YOO, H.; KIM, T. G.; PARK, T. G.; *Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery.* **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 12, p. 1033-1042, 2009.

YOUNG, R. J.; LOVELL, P.; GRANDJEAN, P.; **Introduction to Polymers.** Springer, 1992.

ZELENY, J.; *The electrical discharge from liquid points, and a hydrostatic method of measuring the electric intensity at their surfaces.* **Physical Review**, v. 3, n. 2, p. 69-74, 1914.